



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA

**CULTIVO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* VISANDO A ATIVIDADE
BIOESTIMULANTE VEGETAL**

CURITIBA

2017

AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA

**CULTIVO DE MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* VISANDO A ATIVIDADE
BIOESTIMULANTE VEGETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção título de Doutora em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. M. Eugênia Duarte Nosedá

Dr^a. Jenifer Mota Rodrigues

CURITIBA

2017

OL48c Oliveira, Amanda Cristina de
Cultivo de microalga *Desmodesmus subspicatus* visando a atividade
bioestimulante vegetal / Amanda Cristina de Oliveira. – Curitiba, 2017.
177 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Bioprocessos, 2017.

Orientador: Miguel Daniel Nosedá.

Coorientadoras: Eugênia Duarte Nosedá, Jenifer Mota Rodrigues.

1. *Desmodesmus subspicatus*. 2. Atividade bioestimulante. 3. Fitormônios. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Nosedá, Miguel Daniel. III. Nosedá, Eugênia
Duarte. IV. Rodrigues, Jenifer Mota. V. Título.

CDD: 660.63

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor TECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA** intitulada: **CULTIVO DA MICROALGA *DESMODESMUS SUBSPICATUS* VISANDO ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Outubro de 2017.

MIGUEL DANIEL NOSEDA
Presidente da Banca Examinadora

ORANYS ISAAC MARIN GONZALEZ
Avaliador Externo

CRISTINE RODRIGUES
Avaliador Externo

NAIR SUMIE YOKOYA
Avaliador Externo

MARCIEL JOÃO STADNIK
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos recebidas durante mais essa jornada e por guiar os meus passos em cada fase da minha vida.

À minha família, que sempre me apoiou e deu suporte para o que fosse necessário, sem vocês eu não teria conseguido!

Ao meu orientador Prof. Dr. Miguel Nosedá, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo, em compartilhar seu conhecimento, pelo apoio e orientação.

À minha coorientadora Maria Eugênia pelo conhecimento e experiências compartilhadas.

À Dra. Jenifer Mota, pela coorientação, que mesmo estando a mais de 9 mil Km de distância sempre foi presente, com muita ajuda e incentivo.

Em especial minha amiga Ruth que sempre me apoiou e acreditou infinitamente na minha capacidade. À minha amiga Marisa, que sempre foi um exemplo de coragem e determinação.

Ao longo desses 4 anos tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e especiais, que deixaram meus dias mais alegres, e que também pude aprender muito. Bárbara, que no início era apenas minha colega de cultivos, mas que acabou virando uma amiga, obrigada pela paciência com o meu “jeito” de ser, pelos ótimos conselhos, pelos memes com as minhas “caras” e pela amizade que conquistamos. Ester, desde do início tivemos uma grande afinidade, obrigada por tudo, pelas ajudas, presentes, conversas, risadas. Mieko, japa companheira de todas as horas e alto astral, obrigada pelos momentos na biblioteca, eles não seriam os mesmos sem sua companhia. Jenifer, você é um exemplo de dedicação, eu não imaginei que fosse criar o carinho e a admiração que tenho por você. A dupla Bia e Diego, que além de compartilharem dos mesmos desafios em cultivar microalgas, desde da época da iniciação científica, nunca hesitaram em me ajudar ou em dividir seus conhecimentos comigo.

Aos colegas e amigos do lab 248: André, Michelle, Líria, Jacque, Tati, Rafa, Djuna e do lab E3: Mari, Lu, Fran, Estela, Claudia, Lauri, Luísa, Guilherme, pela amizade, conversas e inúmeras ajudas. Aos colegas dos laboratórios vizinhos 247, 250, 259, 269, E1, E2.

Às meninas da célula BQ-UFPR, Ana, Adri, Ester, Líria, Liana, Iglessias, Cami, Shay, obrigada por todo apoio, ajuda e momentos únicos.

À Estefânia, pelas conversas, inúmeras trocas de informações e conhecimentos com as microalgas.

Aos alunos de Iniciação Científica, Luana, Cauê e Bianka. Em especial aos alunos Daniel e Rafael, vocês foram sem dúvida parte fundamental para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

Ao professor Roberto Pontarolo do departamento de Farmácia, pela colaboração nas análises de UHPLC - MS e a doutoranda Letícia por sempre ser muito gentil e disposta a doar seu tempo para me ajudar nas análises.

Às alunas de Pós doc do departamento de Bioquímica, Edileusa e Anelis por me auxiliarem nas análises de HPLC-MS.

Ao Prof. Átila e Gilda, pelos conhecimentos compartilhados e pelos bioensaios com o tomate.

À professora Thelma Ludwing, à aluna de IC Paula, ao técnico Eduardo e ao centro de MEV pelo auxílio nas análises.

À professora Marguerite Quoirin do departamento de Botânica e aos alunos de mestrado Jean e Júlio por todo auxílio nos cultivos *in vitro* com a cenoura.

Ao professor Leonardo Magalhães e a doutoranda Marina pelo auxílio nos testes biológicos com o Milho.

Ao técnico Ângelo pelas análises termogravimétricas e disposição em ajudar.

À técnica Maria Emília do Departamento de Fitotecnia.

Ao Centro de RMN pelas análises de ressonância.

Ao NPDEAS pelo empréstimo de equipamentos.

Aos programas de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e à Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro

.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Considerando as microalgas como fonte de moléculas bioativas de interesse comercial, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial bioestimulante vegetal da microalga *Desmodesmus subspicatus* quando cultivada sob condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas. Os cultivos autotróficos foram realizados em três diferentes meios, WC, CHU e BG11, com temperatura controlada em 23 ± 2 °C, fotoperíodo 12:12, aeração constante, por um período de 12 dias. Para os cultivos heterotróficos e mixotróficos foi escolhido o meio CHU, com adição de glucose comercial nas concentrações de 1, 5 e 10 g L⁻¹, com temperatura controlada em 23 ± 2 °C, e aeração constante, por um período de 9 dias. Após, os cultivos foram submetidos a centrifugação e liofilização para obtenção da biomassa seca. A biomassa de cada cultivo foi submetida a extração aquosa (10%, 1 h) sob agitação mecânica em temperatura ambiente. O extrato aquoso obtido foi então dialisado (*cut-off* 1 kDa), gerando a fração E (eluída) e R (retida). As frações E, derivadas dos cultivos autotróficos foram ainda fracionadas em cromatografia de exclusão (Bio-Gel P-2), gerando 5 novas subfrações. As biomassas secas, extratos aquosos e frações E obtidas foram submetidas a análises químicas, cromatográficas, espectroscópicas e termogravimétricas. Adicionalmente, as frações EWC, ECHU e EBG foram avaliadas quanto a sua capacidade bioestimulante vegetal, em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*), e raízes de milho (*Zea mays* L.) nas concentrações de 0,1 - 2,0 g/L, tendo produto comercial e água ultrapura como controle positivo e negativo, respectivamente. Nos cultivos autotróficos foi possível alcançar a máxima produção em biomassa com o meio BG11 (0,65 g L⁻¹). Para cultivos heterotrófico e mixotrófico as maiores produções foram obtidas com adição de 10 g L⁻¹ de glucose nos meios, atingindo valores de biomassa de 3,1 e 1,9 g L⁻¹, respectivamente. Análises cromatográficas por UHPLC-MS das frações “E” e subfrações, provenientes dos cultivos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos permitiram a identificação de zeatina em todas as frações, e traços AIA em algumas delas. Análises de RMN das frações, EWC, ECHU, EBG e suas subfrações, e também das frações H1, H5, H10, M1, M5 e M10 permitiram a identificação de glicosídeos, oligossacarídeos, monossacarídeos. Para a atividade bioestimulante vegetal, as sementes de tomate tratadas com a fração ECHU, na concentração 1,0 g L⁻¹ apresentaram maior resposta em relação ao comprimento dos hipocótilos, mostrando-se diferente significativamente dos controles e todos os demais tratamentos analisados. Quando avaliados em relação ao volume dos hipocótilos os tratamentos realizados com as frações ECHU (1,0 e 2,0 g L⁻¹), apresentaram atividades similares ao controle positivo. Quando avaliado o efeito no comprimento das raízes de milho, a fração EFBR CHU (2,0 g L⁻¹) apresentou maior atividade em relação aos controles positivos. Sugere-se que os efeitos positivos dos extratos de *D. subspicatus* observados sobre o comprimento e volume dos hipocótilos de tomate, e raízes de milho estão correlacionados com a presença de zeatina e AIA identificados em todas as frações analisadas. Todos os resultados em conjunto demonstram o potencial econômico e biotecnológico dos extratos de *D. subspicatus*, sendo uma fonte promissora para produção de produtos bioestimulantes.

Palavras chaves: *Desmodesmus subspicatus*, atividade bioestimulante, fitormônios.

ABSTRACT

Since microalgae are a source of bioactive molecules of commercial interest, the present study aimed to evaluate the plant biostimulant potential of microalgae *Desmodesmus subspicatus* when cultivated under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. The autotrophic cultures were performed in three different media: WC, CHU and BG11, with temperature controlled at 23 ± 2 °C, photoperiod 12:12, constant aeration, for a period of 12 days. For the heterotrophic and mixotrophic cultures the CHU medium was chosen, with commercial glucose addition at concentrations of 1, 5 and 10 g L⁻¹, temperature controlled at 23 ± 2 °C, and constant aeration, for a period of 9 days. After, the cultures were centrifugated and lyophilized to obtain the dry biomass. The biomass of each culture was submitted to aqueous extraction (10%, 1 h) under mechanical agitation, at room temperature. The obtained aqueous extract was then dialyzed (cut-off 1 kDa), generating E (eluted) and R (retained) fractions. The E fractions, derived from the autotrophic cultures, were further fractionated by exclusion chromatography (Bio-Gel P-2), yielding 5 new fractions. The dried biomass, aqueous extracts and E fractions obtained were submitted to chemical, chromatographic, spectroscopic and thermogravimetric analyzes. In addition, the EWC, ECHU and EBG fractions were evaluated for their biostimulating capacity in tomato seeds (*Solanum lycopersicum*), at concentrations of 0.1 - 2.0 g L⁻¹; using a commercial product and purified water as positive and negative controls, respectively. In the autotrophic cultures, the maximum biomass productivity was reached with BG11 medium (0.65 g L⁻¹). For heterotrophic and mixotrophic cultures the highest yields were obtained with addition of 10 g L⁻¹ of glucose in the medium, reaching biomass values of 3.1 and 1.9 g L⁻¹, respectively. Chromatographic analyzes by UHPLC-MS of the E fractions and subfractions, from autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures, allowed the identification of zeatin in all fractions, and traces of indole acetic acid in some of them. The NMR analyzes of fractions EWC, ECHU, EBG, and their subfractions, allowed the identification of glycosides, oligosaccharides and monosaccharides. For the biostimulant activity, the tomato seeds treated with the ECHU fraction, in the 1.0 g L⁻¹ concentration, presented a better result in relation to the length of the hypocotyls, being significantly different from the controls and all the other treatments analyzed. When evaluated in relation to the volume of the hypocotyls, the treatments performed with the ECHU fractions, at concentrations 1.0 and 2.0 g L⁻¹, resulted in similar results to the positive control. When the effect on maize root length was evaluated, the fraction EFCR CHU (2.0 g L⁻¹) presented higher activity than the positive controls. It is suggested that the positive effects of the *D. subspicatus* extracts, observed on the length and volume of tomato hypocotyls, are correlated with the presence of zeatin and indole acetic acid, identified in all the analyzed fractions. All the results together demonstrate the economic and biotechnological potential of the extracts of *D. subspicatus*, being a promising source for the production of biostimulant products.

Keywords: *Desmodesmus subspicatus*; biostimulant activity; phytohormones.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MICROSCOPIA DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	27
FIGURA 2 -	PRODUÇÃO DE INÓCULO PARA OS CULTIVOS DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	44
FIGURA 3 -	TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS.....	45
FIGURA 4 -	TÉCNICA DE ESGOTAMENTO POR ESTRIA.....	45
FIGURA 5 -	ARMÁRIO PARA SISTEMA DE CULTIVO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	47
FIGURA 6 -	CULTIVO EM FOTOBIORREATOR DE 100 LITROS.....	49
FIGURA 7 -	ESQUEMA DE CORTE DO EXPLANTE DA CENOURA UTILIZADO NO TESTE BIOLÓGICO	57
FIGURA 8 -	TUBOS DE ENSAIO INOCULADOS COM MEIO MS E EXPLANTES DA CENOURA	57
FIGURA 9 -	ESQUEMA SIMPLES DO PROCESSO PARA REALIZAÇÃO DO BIOENSAIO EM MILHO.....	60
FIGURA 10 -	MICROSCOPIA E CULTIVOS DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS	61
FIGURA 11 -	PERFIL CINÉTICO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	62
FIGURA 12 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	64
FIGURA 13 -	TERMOGRAMAS DAS BIOMASSAS MICROALGAIS BRUTAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS (TG —; DTG —)	68
FIGURA 14 -	TERMOGRAMAS DOS LIPÍDIOS EXTRAÍDOS DA BIOMASSAS MICROALGAIS BRUTAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS (TG —; DTG —).....	71
FIGURA 15 -	MEV DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA SOB CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.....	72

FIGURA 16 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	73
FIGURA 17 - CULTIVO AUTOTRÓFICO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM FOTOBIOREATOR DE 100 L EM MEIO BG11	74
FIGURA 18 - PERFIL CINÉTICO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM FOTOBIOREATOR DE 100 L	75
FIGURA 19 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA EM FOTOBIOREATOR	76
FIGURA 20 - FLUXOGRAMA GERAL DE EXTRAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i>	78
FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO “E” (WC, CHU E BG) POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO EM BIO-GEL P-2	80
FIGURA 22 - RENDIMENTO DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DAS FRAÇÕES EWC, ECHU E EBG DOS CULTIVOS AUTOTRÓFICOS	81
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE FITORMÔNIOS	82
FIGURA 24 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS FITORMÔNIOS IDENTIFICADOS NAS FRAÇÕES “E”	83
FIGURA 25 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA <i>trans</i> -ZEATINA IDENTIFICADA NAS FRAÇÕES EWC, ECHU E EBG	83
FIGURA 26 - QUANTIFICAÇÃO DE <i>trans</i> -ZEATINA PRESENTE NAS FRAÇÕES “E” OBTIDAS DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS	84
FIGURA 27 - ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE <i>trans</i> - ZEATINA NA BIOMASSA DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	87
FIGURA 28 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO EWC E SUBFRAÇÕES EWC2, EWC3 E EWC4	90
FIGURA 29 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO ECHU E SUBFRAÇÕES ECHU2, ECHU4 E ECHU5	92
FIGURA 30 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO EBG E SUBFRAÇÕES EBG2, EBG3 E EBG5	94

FIGURA 31 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS GLICOSÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DERIVADAS DE <i>Desmodemus subspicatus</i>	95
FIGURA 32 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DERIVADAS DE <i>Desmodemus subspicatus</i>	95
FIGURA 33 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DERIVADAS DE <i>Desmodemus subspicatus</i>	96
FIGURA 34 - TERMOGRAMAS DAS BIOMASSAS RESIDUAIS DA EXTRAÇÃO AQUOSA (RS) OBTIDOS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO (TG —; DTG —)	99
FIGURA 35 - TERMOGRAMAS DOS EXTRATOS AQUOSOS (AQ) OBTIDOS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO (TG —; DTG —)	101
FIGURA 36 - TERMOGRAMAS DAS FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO (TG —; DTG —)	102
FIGURA 37 - PROCESSO DE INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES E FORMAÇÃO DE CALOS APÓS 30 DIAS	104
FIGURA 38 - ASPECTO DOS CALOS NO EXPLANTE DE CENOURA SUPLEMENTADO COM FRAÇÃO EBG	105
FIGURA 39 - PORCENTAGEM DE RESPOSTA PARA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE CENOURA SUPLEMENTADOS COM A FRAÇÃO EBG	106
FIGURA 40 - HIPOCÓTILOS DE TOMATE TRATADOS COM FRAÇÃO “E”	108
FIGURA 41 - GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE TOMATE TRATADAS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO ..	109
FIGURA 42 - COMPRIMENTO DOS HIPOCÓTILOS DE TOMATE TRATADOS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	110
FIGURA 43 - VOLUME DOS HIPOCÓTILOS DE TOMATE TRATADOS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO ..	111

FIGURA 44 - RAÍZES DE MILHO TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO “E” OBTIDA A PARTIR DE BIOMASSA CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM FOTOBIOREATOR COM MEIO CHU	114
FIGURA 45 - COMPRIMENTO DAS RAÍZES DE MILHO TRATADAS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSA CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM FOTOBIOREATOR COM MEIO CHU	115
FIGURA 46 - VOLUME DAS RAÍZES DE MILHO TRATADAS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSA CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM FOTOBIOREATOR COM MEIO CHU	116
FIGURA 47 - EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS COM ANTIBIÓTICOS PARA OBTENÇÃO DE CEPA AXÊNICA.....	118
FIGURA 48 - PLACA COM CULTURA AXÊNICA DE MICROALGAS.....	119
FIGURA 49 - CULTIVOS DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS COM MEIO CHU	120
FIGURA 50 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS	121
FIGURA 51 - TERMOGRAMAS DAS BIOMASSAS MICROALGAIS BRUTAS CULTIVADAS HETEROTROFICAMENTE (TG —; DTG —).....	126
FIGURA 52 - TERMOGRAMAS DAS BIOMASSAS MICROALGAIS BRUTAS CULTIVADAS MIXOTROFICAMENTE (TG —; DTG —)	127
FIGURA 53 - FLUXOGRAMA GERAL DE EXTRAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS.....	129
FIGURA 54 - CROMATOGRAMAS DA <i>trans</i> -ZEATINA E FRAÇÕES “E” DOS CULTIVOS HETEROTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS.....	131
FIGURA 55 - ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE <i>trans</i> -ZEATINA NA BIOMASSA SECA DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS	132
FIGURA 56 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO ECHU E DAS FRAÇÕES “E” DERIVADAS DE CULTIVOS HETEROTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS REALIZADOS EM MEIO CHU ADICIONADOS DE 1, 5 E 10 g L ⁻¹ DE GLUCOSE.....	135

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL COMPARADA SOB OS DIFERENTES CULTIVOS - AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO, UTILIZANDO FONTES DE CARBONO ORGÂNICA E INORGÂNICA	30
TABELA 2 -	PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE OS CULTIVOS AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO	31
TABELA 3 -	APLICAÇÃO DE MICROALGAS COM ATIVIDADE BIOESTUMULANTE VEGETAL.....	38
TABELA 4 -	FITORMÔNIOS ENCONTRADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS	40
TABELA 5 -	COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO WC, CHU E BG11.....	42
TABELA 6 -	GRADIENTES DA FASE MÓVEL	55
TABELA 7 -	COMPOSIÇÃO DO MEIO MURASHIGE E SKOOG (MS)	58
TABELA 8 -	PARÂMETROS CINÉTICOS PARA O CRESCIMENTO DE <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	63
TABELA 9 -	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	66
TABELA 10 -	RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA BIOMASSA DE <i>Desmodesmus subspicatus</i>	78
TABELA 11 -	PADRÕES DE FITORMÔNIOS	82
TABELA 12 -	FITORMÔNIOS IDENTIFICADOS E QUANTIFICADOS NAS FRAÇÕES “E” OBTIDAS DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	86
TABELA 13 -	ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO PRESENTES NAS FRAÇÕES “E” SUBFRAÇÕES	97
TABELA 14 -	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	123
TABELA 15 -	RENDIMENTOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA E FRAÇÃO “E” DAS BIOMASSAS CULTIVADAS SOB CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS	129

TABELA 16 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>trans</i> -ZEATINA NAS FRAÇÕES “E” DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO	130
TABELA 17 - ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO PRESENTES FRAÇÕES “E” DERIVADAS DE CULTIVOS HETEROTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS REALIZADO SEM MEIO CHU ADICIONADO DE 1, 5 E 10 g L ⁻¹ DE GLUCOSE	136
TABELA 18 - ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA PRODUÇÃO DE 1000 LITROS DE CULTIVO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM MEIO WC, CHU E BG11	138
TABELA 19 - ESTIMATIVA DE CUSTO PARA PRODUÇÃO DE 1 Kg DO EXTRATO AQUOSO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	141

LISTA DE SIGLAS

ABA - Ácido abscísico

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AIA - Ácido Indol Acético

BA - Benziladenina

BAR - Benziladenosina

BOD - *Biochemical Oxygen Demand* – Demanda Bioquímica de Oxigênio

C- - Controle Negativo

C+ - Controle Positivo

C+ AC - Controle Positivo com ACADIAN™

C+ PL - Controle Positivo com Plant Medium

CME - Centro de Microscopia Eletrônica

CTK - Citocinina

DTG - Derivada Termogravimétrica

E - Fração eluída da dialise em membrana de 1 kDa

EA - Extrato Aquoso

EFBR CHU - Fração Eluída da dialise da biomassa cultivada em FBR no meio CHU

EFBR BG - Fração Eluída da dialise da biomassa cultivada em FBR no meio CHU

EBG - Fração Eluída da dialise da biomassa cultivada em meio BG11

ECHU - Fração Eluída da dialise da biomassa cultivada em meio CHU

EWC - Fração Eluída da dialise da biomassa cultivada em meio WC

FBR - Fotobiorreator

GA - Giberilina

GIA - Grupo Integrado de Aquicultura

Glc - Glucose

H1 - Cultivo heterotrófico com adição de 1 g L⁻¹ de glucose

H10 - Cultivo heterotrófico com adição de 10 g L⁻¹ de glucose

H5 - Cultivo heterotrófico com adição de 5 g L⁻¹ de glucose

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy

J - Constante de acoplamento

K - Cinetina

KR - Cinetina ribosídico

M1 - Cultivo mixotrófico com adição de 1 g L⁻¹ de glucose
M10 - Cultivo mixotrófico com adição de 10 g L⁻¹ de glucose
M5 - Cultivo mixotrófico com adição de 5 g L⁻¹ de glucose
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MS - Espectrometria de massas (Mass Spectrometry)
PBS - Tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline)
Q-TOF - Quadrupolo por Tempo de voo (Time of flight)
R - Fração retida da dialise em membrana de 1 kDa
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RS - Resíduo da Biomassa após extração aquosa
TGA - Análise Termogravimétrica
TRIS - Tris-hidroximetilaminometano
UHPLC - Ultra High Performance Liquid Chromatography
Vo - Volume morto
Vt - Volume total
vvm - Volume de ar por Volume de meio, por Minuto
Z - Zeatina
ZR - Zeatina ribosídio
 α - Configuração anomérica alfa
 β - Configuração anomérica beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	23
1.1.1 Objetivo Geral	23
1.1.2 Objetivos Específicos	23
1.2 JUSTIFICATIVA	24
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 MICROALGAS	25
2.2 CULTIVOS DE MICROALGAS	27
2.2.1 Sistemas de Cultivo	27
2.2.2 Metabolismo das Microalgas	28
2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	31
2.4 ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 MICROALGA	42
3.2 MEIOS DE CULTIVO	42
3.3 MANUTENÇÃO DAS CEPAS	43
3.4 PRODUÇÃO DE INÓCULO	43
3.5 OBTENÇÃO DA CEPA AXÊNICA	44
3.5.1 Esgotamento por Estrias	45
3.5.2 Avaliação da Pureza da Cepa Axênica	46
3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO	46
3.6.1 Cultivos Autotrófico	46
3.6.2 Cultivos Mixotróficos	47
3.6.3 Cultivos Heterotróficos	48

3.6.4 Cultivo em Fotobiorreator (FBR)	48
3.7 ANÁLISES DOS CULTIVOS	49
3.7.1 Densidade Celular	49
3.7.2 Biomassa Seca	50
3.7.3 Determinação dos Parâmetros Cinéticos	50
3.7.4 Métodos Colorimétricos	51
3.7.4.1 Determinação de Carboidratos Totais	51
3.7.4.2 Determinação de Proteínas	51
3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	53
3.9 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR (< 1 kDa) DA BIOMASSA MICROALGAL	53
3.10 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	53
3.10.1 Cromatografia de Exclusão	53
3.10.2 Cromatografia de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (UHPLC-MS)	54
3.11 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	55
3.11.1 Ressonância Magnética Nuclear Monodimensional (¹ H, ¹³ C) e bidimensional (HSQC)	55
3.12 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS	55
3.13 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL	56
3.13.1 Cultivo <i>in vitro</i> de Explante de Cenoura	56
3.13.1.1 Desinfestação	56
3.13.1.2 Obtenção dos Explantes	56
3.13.2 Bioensaios com Sementes de Tomate	58
3.13.3 Bioensaios com Milho	59
3.13.3.1 Desinfestação das Sementes	59
3.13.3.2 Incubação	59

3.14 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1.1 Análise da Cinética de Crescimento de <i>Desmodesmus subspicatus</i>	61
4.1.2 Composição da Biomassa Seca.....	65
4.1.3 Análise Termogravimétrica da Biomassa Microalgal Bruta e Extratos Lipídicos dos Cultivos Autotróficos	67
4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
4.1.5 Cultivo em Fotobiorreator	74
4.1.6 Extração de Compostos de Baixa Massa Molecular da Biomassa Microalgal ..	77
4.1.7 Identificação e Quantificação de Fitormônios nos Extratos da Microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	81
4.1.8 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das Frações “E” e Subfrações dos cultivos autotróficos	88
4.1.9 Análise Termogravimétrica da Biomassa Residual, Extrato Aquoso e Fração “E” dos cultivos autotróficos	98
4.1.10 Determinação da Atividade Bioestimulante Vegetal	103
4.1.10.1 Cultivo <i>in vitro</i> de Explantes de Cenoura (<i>Daucus carota</i>)	103
4.1.10.2 Bioensaios com Sementes de Tomate (<i>Solanum lycopersicon</i>).....	107
4.1.10.3 Bioensaios com Milho.....	113
4.2 AVALIAÇÃO DO CULTIVO HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	117
4.2.1 Obtenção da Cepa Axênica da Microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	117
4.2.2 Análise da Cinética de Crescimento de <i>Desmodesmus subspicatus</i>	119
4.2.3 Composição da Biomassa	123
4.2.4 Análise Termogravimétrica da Biomassa	125
4.2.5 Extração de Compostos de Baixa Massa Molecular da Biomassa Microalgal ..	128
4.2.6 Identificação e Quantificação de Fitormônios nos Extratos da Microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	130

4.2.7 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das Frações “E” dos cultivos heterotróficos e mixotróficos.....	133
4.3 ANÁLISE PRÉVIA DE VIABILIDADE ECÔNOMICA PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE <i>Desmodesmus subspicatus</i>	137
5 CONCLUSÕES	142
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	144
REFERÊNCIAS.....	145
APÊNDICE 1.....	174
APÊNDICE 2.....	175
APÊNDICE 3.....	176
APÊNDICE 4.....	177

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo. Nos últimos anos a agricultura tem sido aprimorada com o uso de tecnologias que visam o aumento expressivo da produtividade e atendam as demandas de mercado (BARDIVIESSO et al., 2011; ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO), 2017). Sendo assim, a demanda por fertilizantes também é grande, chegando a mais de 25 milhões de toneladas em 2015 (ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS (ANDA), 2015). Entretanto, o uso de fertilizantes minerais representa grande impacto ambiental, ocasionando eutrofização das águas, poluição do ar e solo, e a emissão de carbono proveniente de sua produção (BHARDWAJ et al., 2014).

A busca por alternativas sustentáveis e com alta eficiência em substituição aos fertilizantes minerais é crescente. Assim, bioestimulantes vegetais que atuem como substâncias promotoras de crescimento e desenvolvimento vegetal têm ganho importância. Dentre as substâncias naturais já utilizadas, por apresentar efeito promotor do crescimento em plantas, destacam-se os hidrolisados de proteínas e aminoácidos, extratos de macroalgas, derivados de quitina e quitosana, substâncias húmicas e micro-organismos (CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014; DU JARDIN, 2015).

Dentre as substâncias naturais, o uso de extratos de macroalgas vem se expandindo ano após ano (MASNY; BASAK; ŻURAWICZ, 2004). Os extratos algais são normalmente preparados através de tratamentos aquosos, alcalinos ou ácidos, ou do uso de temperaturas extremas que causam o rompimento celular (KHAN et al., 2009; CRAIGIE, 2011). Os extratos de macroalgas, de forma geral, são descritos por exercer um estímulo no crescimento de raízes, aumento da captação de nutrientes, e melhora da tolerância aos estresses bióticos (resistência a patógenos) e abióticos (estresse hídrico e variações de temperatura) (FERRINI; NICESE, 2002; SPINELLI et al., 2009; BARDIVIESSO et al., 2011; CRAIGIE, 2011). Um dos bioestimulantes com destaque na pesquisa científica é o derivado da macroalga marrom *Ascophyllum nodosum* (KHAN et al., 2009; CRAIGIE, 2011).

No Brasil, substâncias que apresentam este efeito estimulante são chamadas de biofertilizantes. O termo é definido como um produto que contém

princípio ativo ou agente orgânico isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar direta ou indiretamente sobre o todo ou parte das plantas cultivadas (BRASIL, 2004).

Nesse contexto, as microalgas surgem como uma boa alternativa. Diversos estudos, com aplicação de extratos de microalgas em plantas como ervilha, trigo, milho, soja, beterraba e tomate, evidenciaram efeitos biofertilizantes, ou seja, efeitos promotores de crescimento vegetal, atribuídos a provável ação de hormônios vegetais contidos nesses extratos microalgais (STIRK et al., 2002; JÄGER et al., 2010; SHAABAN; EL-SAADY; EL-SAYED, 2010; HUSSAIN; HASNAIN, 2011; GONZALEZ; SOMMERFELD, 2015).

Pesquisas relatam a presença de várias categorias de hormônios vegetais em microalgas, como: ácido abscísico (ABA) em *Dunaliella* sp. (TOMINAGA; TAKAHATA; TOMINAGA, 1993); auxina no extrato de *Scenedesmus armatus* e *Chlorella pyrenoidosa* (MAZUR; KONOP; SYNAK, 2001); citocininas em nove espécies de microalgas dos gêneros *Protococcus*, *Chlorella* e *Scenedesmus* (ÖRDÖG et al., 2004); citocininas nas formas de *cis*-zeatina (cZ), isopenteniladenina (IP), *trans*-zeatina (tZ) e dihidrozeatina (DHZ), além de dois tipos de auxinas, o ácido indol acético (AIA) e indolacetamida (STIRK et al., 2013a); giberelina e brassinoesteróides em Chlorophyceae, Trebouxiophyceae e Ulvophyceae (STIRK et al., 2013b). Estes compostos são conhecidos por afetar o metabolismo celular em plantas, controlando a divisão celular, o desenvolvimento de brotos, folhas e raízes, e o retardamento da senescência (TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007; KHAN et al., 2009; CRAIGIE, 2011).

Estudos, envolvendo extratos de microalgas e atividade bioestimulante, vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Química de Carboidratos (Departamento de Bioquímica – UFPR). Mógor et al. (2011) realizou um *screening* da atividade bioestimulante em diversas espécies cultivadas em larga escala para fins de aquicultura (alimentação de organismos marinhos tais como mariscos e moluscos). Dentre as espécies estudadas estavam as microalgas marinhas *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp., *Pavlova* sp. e *Tetraselmis* sp., e as dulciaquícolas *Chlorella* sp., *Spirulina* sp. e *Scenedesmus* sp. Destas, as biomassas ressuspendidas e o extrato aquoso bruto da espécie *Desmodesmus* sp. apresentaram potencial atividade bioestimulante vegetal. Na sequência, Mazepa (2013) analisou extratos aquosos brutos e frações de baixa massa molar (< 1kDa) obtidas a partir de cultivos autotróficos em meio Guillard f/2 de *Scenedesmus subspicatus*, e identificou

glicosídeos (Sulfoquinovosil-glicerol, Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol) e monossacarídeos livres nessas frações. Malburg (2016), adicionalmente aos glicosídeos, identificou nas mesmas frações fitormônios auxinas e citocininas. Todas as moléculas identificadas são de origem intracelular, uma vez que para obtenção das frações, as microalgas foram isoladas do meio de cultura e posteriormente submetidas a um processo de extração aquosa que permitiu a obtenção de tais moléculas.

Embora estudos para avaliar a capacidade bioestimulante de extratos de microalgas já tenham sido desenvolvidos, são necessários outros estudos para identificar todas as moléculas envolvidas na atividade biológica e determinar a exata correlação dos componentes estruturais necessários para a atividade biológica em questão. Além disso, não foram realizados até o momento estudos que avaliem a influência do meio ou sistema de cultivo sobre a produção dos compostos pela microalga *Desmodesmus subspicatus*.

Assim, considerando as microalgas como fonte de moléculas bioativas, busca-se no presente trabalho avaliar a microalga *Desmodesmus subspicatus* quando cultivada em diferentes meios de cultivo e diferentes condições de cultivo, quanto a sua composição, composição química dos seus extratos e atividade bioestimulante vegetal.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir biomassa da microalga *Desmodesmus subspicatus* utilizando condições de cultivo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e avaliar a atividade bioestimulante vegetal do extrato aquoso da biomassa microalgal.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes meios de cultivo no sistema autotrófico para produzir biomassa da microalga *D. subspicatus*;
- Comparar os parâmetros cinéticos, rendimento e composição química das biomassas microalgais produzidas em sistema autotrófico;

- Obter extratos aquosos das diferentes biomassas;
- Determinar a composição química e atividade bioestimulante vegetal dos extratos aquosos;
- Cultivar a microalga *D. subspicatus* em sistema heterotrófico e mixotrófico;
- Comparar os parâmetros cinéticos, rendimento e composição química das biomassas microalgais produzidas em sistema heterotrófico e mixotrófico;
- Obter extratos aquosos das biomassas produzidas;
- Determinar a composição química e atividade bioestimulante vegetal dos extratos aquosos;
- Correlacionar os sistemas de cultivo com a composição química dos extratos aquosos e com a atividade bioestimulante vegetal;
- Realizar análise prévia de viabilidade econômica para obtenção de biomassa microalgal de *D. subspicatus*.

1.2 JUSTIFICATIVA

As microalgas têm se mostrado como uma fonte promissora para novos produtos e aplicações. A identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos, o rápido crescimento que apresentam, a possibilidade de controle das condições de cultivo e consequente direcionamento para produção de compostos com potencial biotecnológico são algumas das razões que têm incentivado a busca de técnicas para a otimização de sistemas de cultivo dessas microalgas. Ditas pesquisas objetivam potencializar a produção e acúmulo de compostos de interesse, como ocorre com os produtos biofertilizantes, que atualmente no mercado são obtidos principalmente de macroalgas.

Com o acúmulo de conhecimento científico acerca do potencial biotecnológico das microalgas, assim como de seus efeitos na promoção do crescimento vegetal mediante a alguns estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa, sugere-se que o extrato aquoso da microalga *Desmodesmus subspicatus* possa atuar alterando o balanço hormonal em plantas, tornando-se um grande potencial para o desenvolvimento de tecnologias ecologicamente corretas e colaborando para o aumento da produtividade e sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola. Desta forma, a relevância deste trabalho de tese está em utilizar a biomassa da microalga *D. subspicatus* como matéria-prima para produção de

bioestimulantes vegetais em substituição aos reguladores vegetais sintéticos, de acordo com a legislação vigente no Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MICROALGAS

Microalgas pertencem a um grupo de micro-organismos heterogêneo. São autotróficos e fotossintéticos, podem ser unicelulares, coloniais e/ou filamentosos, presentes nos meios aquáticos (doce ou salino) ou terrestre, podem variar em tamanho, morfologia e outras características (BICUDO; MENEZES, 2006; LOURENÇO, 2006).

As microalgas podem ser procarióticas ou eucarióticas. As procarióticas encontram-se na classe das Cyanophyceae (cianobactérias). As eucarióticas pertencem principalmente às classes Bacilariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos), Cryptophyceae (criptomônadas), Prasinophyceae e Chlorophyceae (microalgas verdes) (BICUDO; MENEZES, 2006; DEMIRBAS, 2010). De todas as classes, as microalgas Chlorophyceae (Filo Chlorophyta) são as mais comuns, apresentam clorofilas a e b, e carotenoides. Possuem amido (polissacarídeo) como substância de reserva e sua parede celular geralmente contém celulose. O grupo inclui organismos cocoides, flagelados unicelulares ou coloniais, filamentos multicelulares ou multinucleados. As microalgas verdes são cosmopolitas e principalmente dulciaquícolas, no entanto, a maior parte das espécies desenvolvem-se também em habitats marinho, terrestre ou subaéreo (LOURENÇO, 2006).

Dentre a ordem Sphaeropleales (Chlorophyceae), Scenedesmaceae é a maior família de microalgas verdes habitante dos ambientes aquáticos continentais (BICUDO; MENEZES, 2006). Apresentam parede celular constituída por uma camada interna de celulose e uma ou mais camadas externas de esporopolenina, podendo apresentar diversas ornamentações, tais como: espinhos, costelas ou granulações (SHUBERT; WOZNIAK; LIGEZA, 2014). A reprodução ocorre por autósporos formando autocenóbios no interior da célula (RAMOS; BICUDO; MOURA, 2015).

Diferentes estudos envolvendo a filogenia dessa família foram apresentados ao longo dos anos. Atualmente, a família Scenedesmaceae conta com 60 gêneros taxonomicamente aceitos, divididos em quatro subfamílias: Coelastreae, Coelastroideae, Desmodesmoideae e Scenedesmoidea (ALGAEBASE, 2017a). A microalga *Desmodesmus subspicatus*, espécie de estudo do presente trabalho, pertence ao Gênero *Desmodesmus*, Subfamília Desmodesmoideae.

A taxonomia dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* tem sido investigada e debatida por décadas em razão das poucas características fenotípicas de diagnóstico que se diferenciam entre esses gêneros (EL SEMARY, 2011). Meyen (1829) foi o primeiro a descrever o gênero *Scenedesmus* incluindo espécies de microalgas com e sem espinhos. Quase um século depois, Chodat (1926) dividiu o gênero em quatro subgêneros: *Clathrodesmus*, *Desmodesmus*, *Euscenedesmus* e *Rhynchodesmus*. Hegewald (1978), baseado nas características da ultraestrutura da parede celular, apresentou uma nova subdivisão para o gênero *Scenedesmus* Meyen, classificando espécies com quatro camadas de parede esporopolenínica e ornamentos submicroscópicos no subgênero *Desmodesmus* Chodat, e espécies com três camadas esporopolenínica sem estruturas ou com nervuras formadas na camada de parede hemicelulósica nos subgêneros *Scenedesmus* Meyen e *Acutodesmus* Hegewald.

Tentativas de reavaliar a taxonomia de *Scenedesmus* por propriedades bioquímicas e fisiológicas falharam e técnicas de análises de sequências de nucleotídeos foram introduzidas para auxiliar na revisão taxonômica de *Scenedesmus* (KESSLER et al., 1997). Assim, análises de 18S-rDNA ribossomal indicaram que o subgênero *Desmodesmus* era filogeneticamente bem separado do subgênero *Scenedesmus* (KESSLER et al., 1997). Análises subsequentes utilizando sequências da região do espaçador interno transcrito 2 (ITS-2) clarificaram ainda mais a taxonomia de ambos os subgêneros (AN; FRIEDL; HEGEWALD, 1999). Dessa forma, com base na distância genética entre os dois subgêneros e na ultraestrutura bem definida e distinta da parede celular, sustentou-se a retenção do gênero *Scenedesmus* Meyen para organismos não espinhosos e a elevação taxonômica de *Desmodesmus* (Chodat) An, Friedl e Hegewald à gênero, para as espécies que podem suportar espinhos ou outras estruturas visíveis sob microscópio óptico como granulações (AN; FRIEDL; HEGEWALD, 1999; HEGEWALD, 2000). Análises filogenéticas posteriores, baseadas em um modelo revisado de estrutura

secundária para o ITS-2, confirmaram a divisão do gênero *Scenedesmus* em dois novos gêneros: *Scenedesmus* e *Desmodesmus* (HANNEN; FINKGODHE; LURLING, 2002).

A microalga *Desmodesmus subspicatus*, (Figura 1), reclassificada por Hegewald (2000), é clorofilada unicelular e uninucleada. Possui cenóbios planos, com uma, duas ou quatro células dispostas lado a lado. As células podem ser elipsoides ou ovóides; 4,8 – 12 µm comprimento; 2,8 – 6 µm largura; presença frequente de espinho secundário nas células internas, e de um ou dois espinhos laterais nas externas em colônias; espinhos principais em disposição linear; 1,6 – 5,5 µm comprimento, cloroplasto único, parietal e um pirenoide (HENTSCHKE; TORGAN, 2010; SHUBERT; WOZNIAK; LIGEZA, 2014).

FIGURA 1 - MICROSCOPIA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



FONTE: Algaebase (2017b).

2.2 CULTIVOS DE MICROALGAS

2.2.1 Sistemas de Cultivo

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas de cultura abertos ou fechados, com volume variando desde mililitros até bilhões de litros (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Para fins de pesquisa ou manutenção de coleção de microalgas, os cultivos são realizados em pequenos volumes e ambientes climatizados, o que permite maior controle dos fatores que influenciam no crescimento. Já os sistemas de cultivo em escala industrial podem ser realizados em tanques, lagos ou lagoas abertas, ou em sistemas fechados, chamados de

fotobiorreatores (FBR), sob condições naturais de iluminação e temperatura (GRIMA et al., 2003; ERIKSEN, 2008).

As lagoas ou tanques abertos são os mais utilizados na produção comercial das microalgas *Chlorella*, *Dunaliella* e *Spirulina*, devido ao seu baixo custo de construção e fácil operação em relação aos fotobiorreatores. A maior vantagem na utilização de tanques ou lagoas abertas consiste na simplicidade da sua estrutura, com uma produção de biomassa de baixo custo e fácil operacional (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). No entanto, os sistemas abertos apresentam algumas desvantagens, tais como, baixo controle sobre as condições de cultivo, evaporação acentuada, alta taxa de contaminação por microrganismos, grande área para sua construção, entre outros, o que faz com que a produtividade seja muito reduzida comparada aos fotobiorreatores (LOURENÇO, 2006; UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

Os fotobiorreatores, em geral, são mais versáteis, constituídos por uma estrutura mais sofisticada, podendo ser de tubos ou placas planas, construídos com plástico, policarbonato, vidro, entre outros. Sua vantagem está em permitir um maior controle das condições de cultivo, baixa contaminação, maior troca de gases, ocupar uma área menor do que a dos sistemas abertos (LEE; PALSSON, 1995; COGNE; CORNET; GROS, 2005; SUALI; SARBATLY, 2012; JANOSKA et al., 2017). Essas vantagens permitem alcançar uma maior produtividade de biomassa potencializando o acúmulo de produtos de interesse comercial em comparação aos sistemas abertos. Por outro lado, os elevados custos de construção dos fotobiorreatores têm constituído uma grande limitação à aplicação destes sistemas em plantas comerciais (CHEN et al., 2008; ISSARAPAYUP; POWTONGSOOK; PAVASANT, 2009).

No entanto, apesar de todo progresso no desenvolvimento de sistemas de cultivo para microalgas, há ainda lacunas a serem preenchidas no que diz respeito ao tipo de sistema de cultura em relação a espécie de microalga, clima, custos do processo, nutrientes necessários e produto final desejado.

2.2.2 Metabolismo das Microalgas

As características de crescimento e a composição das microalgas são significativamente dependentes do tipo de cultivo a que são submetidas, podendo

ser autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico, diferenciados entre si pela fonte de carbono e energia utilizada (MATA et al., 2010; ZHAN et al., 2016).

O cultivo autotrófico ocorre quando a microalga utiliza luz, solar ou artificial, como fonte de energia, e carbono inorgânico, como fonte de carbono, para produzir energia química através do processo de fotossíntese (WEN; CHEN, 2003; HUANG et al., 2010; PEREZ-GARCIA et al., 2011). No entanto, a limitação de luz em elevadas densidades celulares, ou fotoinibição causada pela luz excessiva, afeta diretamente a produtividade de biomassa microalgal (FIGUEROA et al., 1997). A vantagem desse tipo de cultivo, é a possibilidade de utilização de dióxido de carbono (CO₂), proveniente de atividades industriais ou da queima de combustíveis fósseis, como fonte de carbono inorgânica, contribuindo para a redução das emissões desse gás associado ao efeito estufa (RAWAT et al., 2013; ZHANG et al., 2014b; CHEN et al., 2016b). O CO₂ atmosférico é uma das fontes de carbono mais utilizadas em cultivos autotróficos, em razão da difusão para o interior das células, sendo usado comumente em processos de fixação (MANDAL; MALLICK, 2009; YOO et al., 2010).

Apesar das microalgas serem frequentemente consideradas autotróficas, algumas espécies são capazes de crescer também sob condições heterotróficas (WEN; CHEN, 2003) e mixotróficas (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004), como por exemplo *Spirulina* sp. (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004), *Chlorella vulgaris* (EL-SHEEKH; HAMOUDA; NIZAM, 2013), *Scenedesmus obliquus* (SHEN et al., 2015) e *Nannochloropsis salina* (MARUDHUPANDI et al., 2016).

No metabolismo heterotrófico as microalgas crescem na ausência de luz, e utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e carbono (BHATNAGAR et al., 2011). Açúcares são os substratos mais utilizados, especialmente glucose (CHEN et al., 2006; LIANG; SARKANY; CUI, 2009), porém outras fontes orgânicas de carbono podem ser utilizadas tais como glicerol (O'GRADY; MORGAN, 2011; LEITE et al., 2015) e acetato (ARROYO; WEI; HU, 2010). Esse tipo de cultivo evita problemas associados a limitação de luz, permitindo o uso de fermentadores industriais, como reatores, além de apresentar maior potencial de produção de biomassa microalgal (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010), como podemos observar na Tabela 1.

A escolha pelo metabolismo heterotrófico é questionada devido a necessidade da adição de uma fonte de carbono orgânica, o que pode acarretar em custos elevados, representando até 80% do valor total do meio de cultura

(XIUFENG; XU; WU, 2007). Uma alternativa a esse problema é a utilização de fontes orgânicas de baixo custo (BHATNAGAR et al., 2011; ABREU et al., 2012; LIANG, 2013; GIRARD et al., 2014; CHEN et al., 2015b; SALATI et al., 2017). Diversas fontes alternativas de carbono orgânico têm sido propostas, como por exemplo: hidrolisado de milho (XU et al., 2006), hidrolisado de amido de mandioca (WEI et al., 2009), hidrolisado de sorgo doce (GAO et al., 2010); suco de sorgo (LIANG et al., 2010) melaço de cana (YAN et al., 2011) hidrolisado lignocelulósico (HAKALIN, 2014). Entre essas fontes alternativas destaca-se o melaço, subproduto do processamento da cana-de-açúcar. Seus carboidratos representam mais de 50% de sua composição, conferindo grande potencial como fonte alternativa de carbono na suplementação de meios de cultivo para microalgas (ANDRADE; COSTA, 2007).

TABELA 1 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL COMPARADA SOB OS DIFERENTES CULTIVOS - AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO, UTILIZANDO FONTES DE CARBONO ORGÂNICA E INORGÂNICA

MICROALGA	METABOLISMO	BIOMASSA (g L ⁻¹ d ⁻¹)	REFERÊNCIA
<i>Botryococcus braunii</i>	Autotrófico ^a	0,03	YOO et al., 2010.
<i>Chlorella minutissima</i>	Autotrófico ^a	0,02	ILLMAN et al., 2000.
<i>Desmodesmus communis</i>	Autotrófico ^{a, b}	0,11 – 0,02	SAMORÌ et al., 2013.
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Autotrófico ^b	0,12	GOUVEIA, OLIVEIRA, 2009.
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Autotrófico ^a	0,37 – 0,48	CHIU et al., 2009.
<i>Pavlova salina</i>	Autotrófico ^a	0,16	RODOLFI et al., 2009.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Autotrófico ^b	0,09	GOUVEIA, OLIVEIRA, 2009.
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Autotrófico ^a	0,19	RODOLFI et al., 2009.
<i>Scenedesmus</i> sp.	Autotrófico ^a	0,22	YOO et al., 2010.
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico ^c	0,74	CHENG et al., 2009.
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico ^c	0,10	WEN et al., 2013.
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico ^c	2,00	XU et al., 2006.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Heterotrófico ^{c, d}	0,08 – 0,15	LIANG; et al., 2009.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Heterotrófico ^f	0,02	YEH et al., 2012.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Heterotrófico ^c	0,17	GIM et al., 2014.
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Heterotrófico ^c	0,57	ZHAO et al., 2012.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mixotrófico ^{c, e}	0,09 – 0,25	LIANG et al., 2009.
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Mixotrófico ^e	0,04 – 0,043	DAS et al., 2011.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Mixotrófico ^c	0,51	MANDAL; MALLICK, 2009.
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Mixotrófico ^c	0,35	ZHAO et al., 2012.
<i>Spirulina platensis</i>	Mixotrófico ^c	0,26 – 0,82	ZHANG et al., 2014b.

NOTA: Fontes de carbono: ^a CO₂; ^b ar atmosférico; ^c glucose; ^d acetato; ^e glicerol; ^f sacarose; ^g melaço.

Nos cultivos com metabolismo mixotrófico, as microalgas dispõem simultaneamente de fontes de carbono orgânicas (BHATNAGAR et al., 2011). A vantagem desse tipo de cultivo é que as microalgas podem sintetizar compostos característicos de ambos os metabolismos, e apresentar taxas de produções mais elevadas quando comparadas aos cultivos autotróficos. Adicionalmente, esses cultivos podem também ser suplementados com fontes alternativas de carbono, reduzindo assim o custo da produção de biomassa microalgal (CHEN et al., 2011, 2016b; ZHAN; RONG; WANG, 2017).

Cultivos heterotróficos e mixotróficos frequentemente sofrem com a susceptibilidade à contaminação devido a adição da fonte de carbono orgânica (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006). Assim, faz-se necessária a utilização de uma cultura axênica, garantindo uma melhor produção e composição pura dos produtos de microalgas (LOURENÇO, 2006).

As principais diferenças entre os diferentes metabolismos das microalgas são resumidas na Tabela 2.

TABELA 2 - PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE OS CULTIVOS AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO

	AUTOTRÓFICO	HETEROTRÓFICO	MIXOTRÓFICO
FONTE DE ENERGIA	Luz	Orgânica	Luz e Orgânica
FONTE DE CARBONO	Inorgânica (CO ₂)	Orgânica (p.e. glucose, glicerol, acetato)	Inorgânica e Orgânica
TIPO DE REATOR	Aberto ou Fechado	Fermentador	Fechado
CUSTO	Baixo	Alto	Alto
VANTAGENS	Alta produção de pigmentos; baixa contaminação	Maior taxa de crescimento	Maior taxa de crescimento
DESVANTAGENS	Baixa taxa de crescimento	Alta taxa de contaminação; Condições escuras diminuem produção de pigmentos	Alta taxa de contaminação

FONTE: Adaptado de Hakalin (2014) e Zhan; Rong; Wang, (2017).

2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

A utilização de microalgas por alguns povos nativos da Ásia, África e México é secular. Entretanto, apenas a algumas décadas, as microalgas vêm despertando interesse comercial, em razão da sua composição química e capacidade de produzir

diversos compostos bioativos industrialmente importantes e de alto valor agregado (SPOLAORE et al., 2006; BOROWITZKA, 2013).

Devido ao seu alto teor de proteína, carboidrato, lipídios vitaminas e aminoácidos, algumas microalgas gênero *Chlorella*, *Spirulina* têm sido comercializadas como suplemento alimentar humano, sob forma de pó, tabletes ou cápsulas e também são utilizadas como corantes naturais em alimentos e cosméticos, por produzirem pigmentos, como carotenoides, clorofilas (chlorophytas) e ficocianina (cianobactérias) (YAMAGUCHI, 1996; LIANG et al., 2004; CHEN et al., 2016a; DELATTRE et al., 2016; POSTMA et al., 2017). Além disso, são incorporadas como aditivo e/ou suplemento em ração animal para cães, gatos, aves, peixes de aquário, e principalmente na aquicultura de crustáceos, moluscos e peixes (ex: coloração característica do salmão) (BROWN et al., 1997; CERTIK; SHIMIZU, 1999; SPOLAORE et al., 2006; BECKER, 2007).

As microalgas, na indústria de alimentos, vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de produtos nutracêuticos. O termo nutracêutico representa alimentos ou parte dos alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças (MORAES; COLLA, 2006). Podem ser citados: ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (ácido eicosapentaenóico - EPA, ácido docosahexaenóico – DHA e ácido araquidônico - ARA) essenciais para nutrição humana e importantes no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, artrite, e o uso por lactantes para o desenvolvimento do bebê (WEN; CHEN, 2003; KURATKO; SALEM, 2013; CHEN et al., 2015a; WANG et al., 2015), e vitaminas A, B e E, com importantes funções para nosso organismo (BROWN; FARMER, 1994; CARBALLO-CÁRDENAS et al., 2003; HE; LI; CHEN, 2005; DURMAZ, 2007).

Outros produtos com grande aplicação nutracêutica são os carotenoides (luteína, astaxantina, β -caroteno, licopeno) com efeitos antioxidantes, anticancerígeno, anti-inflamatório, antiangiogênico, e melhora do sistema imunológico, como é o caso da astaxantina produzida pela microalga *Haematococcus pluvialis* e β -caroteno de *Dunaliella salina* (LI et al., 2011; PANGESTUTI; KIN, 2011; GONG; BASSI, 2016).

Microalgas e seus produtos derivados são também utilizados pelas indústrias de cosmética como fonte para cosmecêuticos (produtos cosméticos contendo ingrediente biologicamente ativo), como por exemplo, em cremes com

efeito antienvhecimento, clareadores, regenerante ou hidratantes. Outras aplicações cosméticas a partir de microalgas estão representadas em produtos para cabelo e proteção solar, pigmentos como corantes e polissacarídeos como espessantes. Estudos evidenciam a síntese de colágeno na pele, melhorando a regeneração dos tecidos e redução de rugas (STOLZ; OBERMAYER, 2005; WANG et al., 2015).

Diferentes atividades biológicas, tais como imunomodulador, antibacteriana, anticoagulante, antimutagênico, antioxidantes, antiviral, anticancerígenos e anti-inflamatórios, já foram descritas e relacionadas aos vários tipos de polissacarídeos produzidos por *Isochrysis galbana*, *Chlorella ellipsoidea* e *Spirulina platensis* (ARAD; ONTMAN, 2010; KURD; SAMAVATI, 2015; ABDELHEDI et al., 2016; QI; KIM, 2017).

Diversos estudos descrevem as vantagens do uso das microalgas para produção de diferentes biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biogás e hidrogênio), em comparação com outras matérias primas disponíveis. As microalgas possuem alta taxa de crescimento, permitem o uso de água não potável, produção sazonal, maior síntese de lipídios, possibilidade de serem cultivadas em fotobiorreatores compactos, gerando uma produção sustentável e econômica (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; BRENNAN; OWENDE, 2010; NOBRE et al., 2013; MILANO et al., 2016; SU et al., 2017). Algumas espécies de microalgas (*Chlorella protothecoides*, *C. vulgaris*, *Cryptocodinium cohnii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Skeletonema costatum*, *Pseudokirchneriella subcapitata*) apresentam um rendimento de óleo 3 vezes superior quando comparado com o biodiesel de soja (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; DEL RÍO et al., 2017).

Outras pesquisas destacam o potencial das microalgas *Desmodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp. no tratamento de diversos tipos de efluentes e águas residuais (JI et al., 2014; SCHERER et al., 2017). Esses micro-organismos apresentam alta capacidade em utilizar NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} como nutrientes para seu desenvolvimento. As microalgas do gênero *Scenedesmus* sp. se destacam por apresentarem um potencial para absorção de íons de metais pesados, como Cr^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} . Microalgas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus* sp., e também na mitigação de gases poluentes pela assimilação do CO_2 como fonte de carbono, provenientes da queima de combustíveis fósseis e indústrias (CHOJNSCKA; CHOJNACKI; GÓRECKA, 2005; MUNOZ; GUIEYSSE, 2006; WANG et al., 2008; CHEN et al., 2013; GRESSLER et

al., 2014; KUMAR et al., 2015; ZHOU et al., 2015; BAICHA et al., 2016; TURON et al., 2016; KASSIM; MENG, 2017).

Recentemente, as microalgas têm sido empregadas na agricultura como biofertilizantes e bioestimulantes de solos e plantas (GARCIA-GONZALEZ; SOMMERFELD, 2015; CHEW et al., 2017), e são comercializadas com a alegação de melhorar o rendimento do plantio, aumentar a floração e o número de frutos, melhorar sua qualidade com aumento no valor nutricional, maior desenvolvimento de raízes, capacidade em promover a regeneração de tecido e aumento a resistência a pestes (ALLGROW, 2017; ALGAENERGY, 2017). Alguns estudos atribuem esse efeito em plantas a provável ação dos hormônios vegetais contidos em extratos das microalgas *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus armatus*, *Nannochloropsis oceânica*, como as auxinas, citocininas e giberelinas (MAZUR; KONOP; SYNAK, 2001; STIRK et al., 2013a; b).

Os dados apresentados revelam que a aplicação biotecnológica das microalgas já é uma realidade e em contínua expansão para novos produtos.

2.4 ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL

A agricultura mundial mantém-se em constante expansão, sendo um dos maiores desafios o desenvolvimento de novos sistemas sustentáveis e ambientalmente corretas (POVERO et al., 2016). Estima-se que até o ano de 2050 a produção de alimentos deva dobrar para atender a uma projeção mundial de 9 bilhões de pessoas (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO), 2017). Nos últimos anos, a agricultura tem sido aprimorada com novas tecnologias que visam o aumento expressivo da produtividade (BARDIVIESSO et al., 2011). Entretanto, os sistemas agrícolas atuais são não sustentáveis, dependentes de produtos como fertilizantes sintéticos, que compromete a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas a médio e longo prazo. Os fertilizantes sintéticos derivam de fontes finitas (combustíveis fósseis, reservas minerais) para produção e estão constantemente relacionados a problemas ambientais, como eutrofização de recursos hídricos, infertilidade dos solos, acidificação e aumento da salinidade dos solos, geração de gases do efeito estufa e destruição da camada de ozônio devido sua composição apresentar grandes

quantidades de nitrogênio, fósforo e potássio (UDVARDI et al., 2015; CHEN et al., 2017).

Os fertilizantes nitrogenados estão entre os mais utilizados e os que causam maior impacto ambiental. Sua produção, distribuição e a aplicação mecânica a campos agrícolas, consomem grande quantidade de combustíveis fósseis, produzindo quantidades correspondentes de dióxido de carbono (CO₂) (UDVARDI et al., 2015; EPA, 2017). Adicionalmente, cerca de metade de todo fertilizante nitrogenado aplicado aos campos é capturado e usado pela cultura alvo, enquanto o resto é perdido para o meio ambiente, contribuindo substancialmente para as emissões de gases de efeito estufa (FLYNN; SMITH, 2010; UDVARDI et al., 2015; ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), 2017).

O Brasil é um importante consumidor mundial de fertilizantes sintéticos, ficando atrás apenas da China, Índia e Estados Unidos. No entanto, a produção brasileira de fertilizantes é insuficiente para atender sua própria demanda, recorrendo à importação para suprir o mercado interno. Estima-se que 75% de todo fertilizante sintético consumido decorre de importação (ANDA, 2015).

O uso de bioestimulantes ou biofertilizantes vegetais é uma prática crescente na agricultura moderna, e vem sendo considerado uma alternativa, rentável e sustentável, ao uso de fertilizantes sintéticos (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA), 2016). Sua utilização tem por objetivo melhorar qualitativa e quantitativamente a produtividade das culturas, assim como, diminuir a poluição e os impactos ambientais (SPINELLI et al., 2009; MORAES, 2015a; SCAGLIA; POGNANI; ADANI, 2017).

Na Europa, o Conselho Europeu da Indústria de Bioestimulante define os bioestimulantes vegetais como produtos que contêm substâncias e/ou microrganismos que quando aplicadas às plantas ou à rizosfera, são capazes de estimular processos naturais para aumentar ou melhorar a absorção de nutrientes, a eficiência nutricional, a tolerância a estresses abióticos, e a qualidade do cultivo (EUROPEAN BIOSTIMULANTS INDUSTRY COUNCIL (EBIC), 2015). Nos Estados Unidos, os bioestimulantes vegetais são definidos como substâncias e/ou microrganismos, que quando aplicados em pequenas quantidades podem aumentar o crescimento e desenvolvimento da planta, melhorar a eficiência de absorção de nutrientes ou a redução das perdas de nutrientes para o ambiente, bem como

melhorar a estrutura do solo, função ou desempenho e assim aumentar a resposta da planta (BIOSTIMULANTS COALITION, 2017).

Em termos de aspectos legais no Brasil, os biofertilizantes vegetais estão dispostos na lei de fertilizantes no 6.894, regulado pelo decreto no 4.954 de 2004, e atualizado através do decreto no 8.059 de 2013, que define biofertilizante como:

“Produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante” (BRASIL, 2013).

A definição e o conceito de bioestimulante vegetal ainda não está bem estabelecido no Brasil, uma vez que a lei não cita o termo “bioestimulante”. Segundo o pesquisador da Embrapa Hortaliças, Daniel Zandonadi, os produtos biofertilizantes pertençam à classe de bioestimulantes (MORAES, 2015b). Já a Associação Brasileira das Indústrias de Tecnologia em Nutrição Vegetal (ABISOLO) define bioestimulantes como reguladores de crescimento, e não fertilizantes, e recomenda o uso do termo biofertilizantes apenas para produtos associados a nutrição de plantas (ABISOLO, 2015). Schmidt (1992) define bioestimulantes como substâncias que contêm hormônios vegetais que podem estimular o crescimento quando aplicadas de forma exógena.

Essas substâncias, chamadas de bioestimulantes, são aplicadas diretamente nas plantas (folhas ou frutos) ou em sementes, e apresentam capacidade de promover ou modificar os processos morfológicos e fisiológicos a fim de aumentar a produtividade dos cultivos em diferentes estágios (CASTRO, 2006; DU JARDIN, 2015; MORAES, 2015b). O uso de bioestimulantes acarreta em maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos nas plantas, aumento na biodisponibilidade de nutrientes e minerais, resistência a patógenos, maior crescimento das raízes e brotos, melhorando o crescimento, qualidade e produtividade da planta (CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014; SCAGLIA; POGNANI; ADANI, 2017). Esses efeitos estão associados à capacidade desses compostos em influenciar a atividade hormonal nas plantas (CATO, 2006).

Diversos produtos têm sido comercializados como biofertilizantes e bioestimulantes agrícolas (POVH, 2008; CARVALHO; CASTRO, 2014; BATTACHARYYA et al., 2015). Em 2016, o mercado global de bioestimulantes movimentou 1,97 bilhões de dólares, e há uma estimativa de crescimento de 11%

até 2021 alcançando 3,3 bilhões de dólares (MARKETDATAFORECAST, 2016). Segundo a Agronews (2016), na América Latina o mercado de bioestimulantes é dominado pelo Brasil, que em 2014 teve um consumo de 42%, esse consumo se deve a adoção e busca por práticas agrícolas sustentáveis.

Esses produtos possuem diferentes variações em sua composição. Podem ser compostos por reguladores vegetais, ou reguladores vegetais associados a aminoácidos, nutrientes, vitaminas, substâncias húmicas, hidrolisado de proteínas, extrato de algas, microrganismos e outros (CASTRO, 2006; ABDEL-RAOUF; AL-HAMAIDAN; IBRAHEEM, 2012; CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014; CANELLAS et al., 2015; COLLA et al., 2015; MORAES, 2015a; SAA et al., 2015; EMBRAPA, 2016; BIOSTIMULANTS COALITION, 2017).

Entre os produtos comercializados como bioestimulantes de eficácia comprovada, destaca-se o uso de extratos de macroalgas, em maioria derivados da espécie *Ascophyllum nodosum* (KHAN et al., 2009). De modo geral, os extratos de macroalgas são constituídos de macro e micronutrientes, aminoácidos, oligossacarídeos e hormônios vegetais, especificamente por citocininas, auxinas, ácido abscísico e giberelinas (RIOUX; TURGEON; BEAULIEU, 2007; TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007; KHAN et al., 2009; CRAIGIE, 2011; RENGASAMY et al., 2016). Esses compostos interagem de forma sinérgica, para aumentar o crescimento de plantas terrestres. Entretanto, o grande desafio das indústrias é manter a disponibilidade de fonte de material, no caso, as macroalgas, uma vez que sua colheita tem sido controversa em função dos potenciais impactos biológicos (CRAIGIE, 2011; SEELEY; SCHLESINGER, 2012; HALAT et al., 2015).

Microalgas têm sido propostas como uma fonte interessante e quase ilimitada na busca de novos compostos bioativos. As vantagens da sua utilização estão associadas a possibilidade de serem usadas em condições controladas e sua capacidade em produzir metabólitos em diferentes condições (PLAZA et al., 2009). Estudos têm relatado o potencial das microalgas como bioestimulante vegetal (SHAABAN, 2001; HUSSAIN; HASNAIN, 2011; GARCIA-GONZALEZ; SOMMERFELD, 2015; ELARROUSSI et al., 2016), por apresentarem em sua composição diferentes substâncias como aminoácidos (JIE et al., 2008; RAMOS; BICUDO; MOURA, 2015), proteínas, polissacarídeos, vitaminas, minerais (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; CHEW et al., 2017) e hormônios vegetais (LU; XU, 2015), também chamados de fitormônios (GASPAR et al., 1996).

Já existem produtos comercialmente disponíveis provenientes de microalgas. Esses produtos são caracterizados por conter elevado teor de aminoácidos livres, polissacarídeos, antioxidantes, fitormônios e oligoelementos (ALGAENERGY, 2017; ALLGROW, 2017; BIORIZON, 2017), entretanto, nenhum desses produtos são de origem nacional.

Estudos utilizando extratos derivados de diferentes espécies de microalgas, demonstraram um claro efeito benéfico no desenvolvimento de plantas (Tabela 3). Os efeitos bioestimulantes foram atribuídos a provável ação de fitormônios contidos nesses extratos de microalgas (STIRK et al., 2002; JÄGER et al., 2010; HUSSAIN; HASNAIN, 2011).

TABELA 3 - APLICAÇÃO DE MICROALGAS COM ATIVIDADE BIOESTUMULANTE VEGETAL

PLANTA	EFEITO	MICROALGA	REFERÊNCIA
Pepino	Aumento no número de raízes e peso dos cotilédones de pepino	<i>Chlorella</i> sp. <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Chlamydomonas</i> sp.	STIRK et al., 2002.
Milho Pepino	Aumento nas anteras de milho Aumento número de raízes e peso dos cotilédones de pepino	<i>Klebsormidium</i> sp. <i>Neochloris</i> sp.	JÄGER et al., 2010.
Trigo	Aumento do peso seco e maior absorção de macronutrientes nas plantas	<i>Scenedesmus</i> sp.	SHAABAN; EL-SAADY; EL-SAYED, 2010.
Trigo	Maior altura da parte aérea da planta, aumento no comprimento das espigas, aumento peso seco e número de grãos de trigo	<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	HUSSAIN; HASNAIN, 2011.
Tomate	Aumento do comprimento e volume dos hipocótilos	<i>Desmodesmus subspicatus</i> *	MAZEPA, 2013.
Trigo Milho	Maior aceleração da germinação das sementes e produtividade em plantas adultas	<i>Spirulina máxima</i>	MORAES, 2015a.
Tomate Pimenta	Aumento no tamanho das plantas, maior densidade nas raízes	<i>Spirulina platensis</i>	ELARROUSSI et al., 2016.
Tomate	Germinação mais rápida, maior crescimento das plantas, aumento no número de frutos	<i>Acutodesmus dimorphus</i>	GONZALEZ; SOMMERFELD, 2015.
Tomate	Aumento na massa dos frutos, área foliar, aumento da massa fresca e seca das folhas, maior diâmetro do caule apical	<i>Desmodesmus subspicatus</i> *	GEMIN, 2016.

NOTA: * Citada como *Scenedesmus subspicatus*.

Fitormônios são moléculas orgânicas, não nutrientes, encontrados de forma natural durante todos os estágios de desenvolvimento das plantas, são produzidos e transportados em diferentes locais nas plantas, estão presentes em concentrações muito baixas, aproximadamente picogramas por grama de biomassa seca (TARKOWAKÁ et al., 2014), e são responsáveis pelos processos fisiológicos e morfológicos em plantas (VOB et al., 2014). As principais classes de fitormônios são constituídos por: auxinas (AIA), citocininas (CKs), giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) e etileno (ET), e mais recentemente, ácido jasmônico (AJ), brassinosteróides (BRs), ácido salicílico (AS) e estrigolactona (SL) (TARKOWAKÁ et al., 2014; WANI et al., 2016). Essas classes podem atuar de forma sinérgica ou antagonista (SHIGENAGA; ARGUESO, 2016).

As auxinas estão envolvidas nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas. O ácido indol acético (AIA), forma mais predominante de auxina, é responsável pela expansão, divisão, alongamento e diferenciação celular, e possui importante papel no desenvolvimento de plantas sob condições de estresse (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006; NAPIER, 2017). As citocininas estão relacionadas a quase todos os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo responsáveis pela divisão e diferenciação celular, formação de raízes e brotos, e senescência de folhas, sendo a zeatina a citocinina mais abundante (SAKAKIBARA, 2006; WERNER; SCHMÜLLING, 2009). As giberelinas estão envolvidas em funções como expansão foliar, alongamento do caule, floração e desenvolvimento do fruto. Cerca de 100 giberelinas diferentes já foram descobertas, porém somente algumas, como GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇, apresentam atividade (YAMAGUCHI, 2008). O ácido abscísico (ABA), está ligado a respostas de estresse biótico e abiótico das plantas, atua no desenvolvimento do embrião, maturação, dormência e germinação das sementes e fechamento dos estômatos (TARKOWAKÁ et al., 2014). Diversos estudos já evidenciaram a presença de diferentes classes de fitormônios endógenos em microalgas Tabela 4.

Embora os processos de biossíntese desses fitormônios em plantas sejam muito bem descritos na literatura (SANTNER; VILLALOBOS; ESTELLE, 2009), em microalgas, seu papel fisiológico e efeitos endógenos ainda não são confirmados, e suas vias metabólicas não são conhecidas (TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007; BAJGUZ, 2009a; STIRK et al., 2011; LU et al., 2014; LU; XU, 2015).

TABELA 4 - FITORMÔNIOS ENCONTRADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS

MICROALGA	MÉTODO DE EXTRAÇÃO	FITORMÔNIO	REFERÊNCIAS
<i>Dunaliella parva</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Químico ^{a,b}	Ácido abscísico	TIETZ et al., 1989.
<i>Dunaliella</i> sp.	Químico ^c	Ácido abscísico	TOMINAGA; TAKAHATA; TOMINAGA, 1993.
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Scenedesmus armatus</i>	Químico ^b	Ácido indol acético	MAZUR; KONOP; SYNAK, 2001.
<i>Chlorella minutissima</i> <i>Chlorella</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp.	Não mecânico ^f Químico ^a	Citocininas	ÖRDÖG et al., 2004
<i>Chlorella vulgaris</i>	Químico ^c	Ácido abscísico	BAJGUZ, 2009a.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Químico ^{b, e}	Brassinosteróides	BAJGUZ, 2009b.
<i>Chlorella minutissima</i> <i>Chlorella</i> sp.	Químico ^a	Citocinina	STIRK et al., 2011.
<i>Acutodesmus acuminatus</i> <i>Acutodesmus incrassatus</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella minutissima</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Desmodesmus armatus</i>	Químico ^b	Auxina Citocinina	STIRK et al., 2013a.
<i>Chlorella minutissima</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Desmodesmus armatus</i>	Físico ^h Químico ^{b, d}	Giberelinas Brassinosteróides	STIRK et al., 2013b.
<i>Chlorella minutissima</i>	Físico ^h Químico ^{b, d}	Auxina Citocinina Giberilina Ácido abscísico Brassinosteróides	STIRK et al., 2014.
<i>Desmodesmus subspicatus</i> *	Químico ^g	Citocinina	MALBURG, 2016.

NOTA: ^a etanol; ^b metanol; ^c acetona; ^d acetonitrila; ^e clorofórmio; ^f nitrogênio líquido; ^g água; ^h sonicador.* Citada como *Scenedesmus subspicatus*.

A utilização de microalgas como matéria-prima para produção de bioestimulantes vegetais é bastante promissora, se mostrando renovável e sustentável, com potencial para colaborar no aumento da produtividade dos sistemas de produção agrícola no Brasil. Adicionalmente, o uso da microalga para essa finalidade oferece uma nova visão e apresenta uma nova oportunidade no desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

Trabalhos anteriores envolvendo fitormônios, algas e atividade bioestimulante vegetal já foram descritos na literatura, entretanto, existem poucos estudos detalhando a estrutura química e a relação entre os compostos obtidos de microalgas e a atividade bioestimulante. Desta forma, o presente trabalho visa explorar o potencial da microalga *Desmodesmus subspicatus* como fonte de extratos

naturais bioestimulantes e identificar a influência do meio e condições de cultivo sobre a produção de moléculas bioativas pela microalga.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICROALGA

A espécie de microalga utilizada neste estudo foi *Desmodesmus subspicatus* (HEGEWALD, 2000), cedida pelo Grupo de Pesquisa Integrado de Aquicultura (GIA-UFPR), identificada pelo Instituto de Botânica de São Paulo e preservada na coleção de culturas de microalgas na Universidade Federal Fluminense - UFF.

3.2 MEIOS DE CULTIVO

Os meios de cultura utilizados nesse trabalho foram WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) CHU (adaptado ABNT NBR 12648) e BG11 (STANIER et al., 1971) conforme a composição descrita na Tabela 5. Todos os meios de cultura tiveram seu pH inicial ajustado para 7,0 e foram autoclavados (121 °C por 15 minutos em 1 atm), antes do processo de inoculação.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO WC, CHU E BG11

COMPONENTE	(continua)		
	WC (g L ⁻¹)	CHU (g L ⁻¹)	BG11 (g L ⁻¹)
MACRONUTRIENTES			
C ₆ H ₈ O ₇	-	-	6.10 ⁻³
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,6.10 ⁻²	-	3,6.10 ⁻²
CaCl ₃ .2H ₂ O	-	2,5.10 ⁻²	-
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ NaO ₈	4,36.10 ⁻³	5.10 ⁻¹	1.10 ⁻³
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	4,98.10 ⁻²	-
H ₃ BO ₃	-	1,142.10 ⁻¹	2,86.10 ⁻³
K ₂ HPO ₄	8,7.10 ⁻³	7,5.10 ⁻²	4.10 ⁻²
KH ₂ PO ₄	-	1,75.10 ⁻¹	-
KOH	-	3,1.10 ⁻¹	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,6.10 ⁻²	7,5.10 ⁻²	7,5.10 ⁻²
Na ₂ CO ₃	-	-	2.10 ⁻²
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	2,8.10 ⁻²	-	-
NaCl	-	2,5.10 ⁻²	-
NaHCO ₃	1,26.10 ⁻²	-	-
NaNO ₃	8,5.10 ⁻²	2,5.10 ⁻¹	1.5.10 ⁻⁰
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	-	-	6.10 ⁻³

			(conclusão)
COMPONENTE	WC (g L ⁻¹)	CHU (g L ⁻¹)	BG11 (g L ⁻¹)
MICRONUTRIENTES			
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	4,9.10 ⁻⁶	4,94.10 ⁻⁵
CoCl ₂ .6H ₂ O	1.10 ⁻³	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.10 ⁻³	1,57.10 ⁻⁵	7,9.10 ⁻⁵
FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15.10 ⁻³	-	-
H ₃ BO ₃	1.10 ⁻⁴	-	2,86.10 ⁻³
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,8.10 ⁻³	1,44.10 ⁻⁵	1,81.10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6.10 ⁻²	7,1.10 ⁻⁶	3,9.10 ⁻⁴
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.10 ⁻³	8,82.10 ⁻⁵	2,22.10 ⁻⁴
VITAMINAS			
Biotina	5.10 ⁻⁷	-	-
Tiamina	1.10 ⁻⁴	-	-
Cianocobalamina	5.10 ⁻⁷	-	-
TAMPÃO			
TRIS	5.10 ⁻¹	-	-

3.3 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

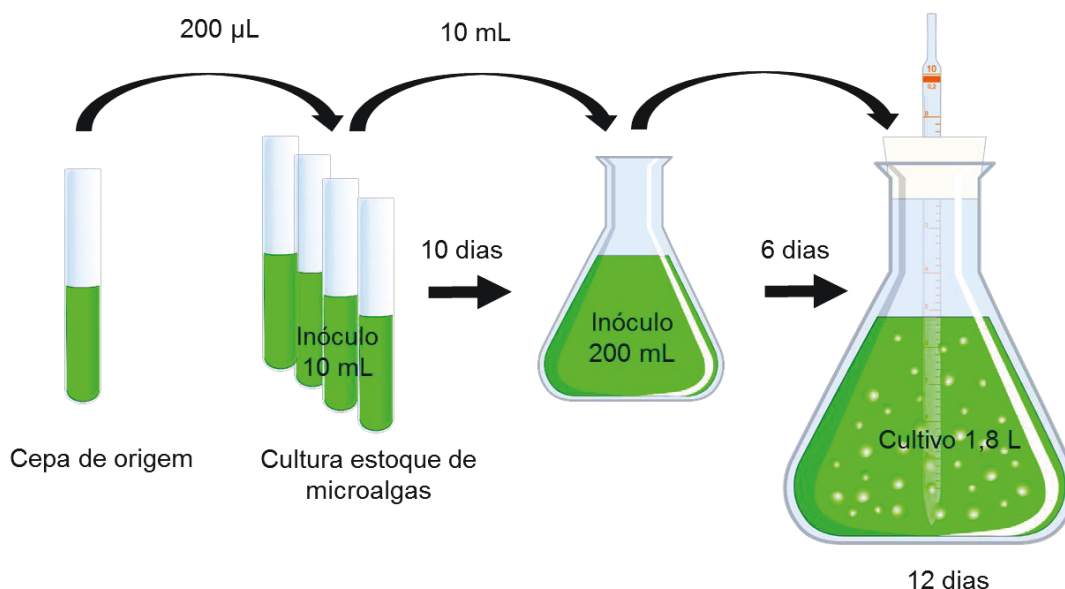
Após o recebimento da cepa de origem, 200 µL da cultura foi inicialmente repicada em tubos de ensaio de 50 mL, contendo 10 mL de meio de cultivo. Em seguida, as cepas foram mantidas por 10 dias em estantes de cultivo, sob iluminação de aproximadamente 111,5 µmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo 12:12 h e temperatura constante de 23 °C ± 2 °C. Agitação manual foi realizada a cada 2 dias, promovendo a ressuspensão das células, com o objetivo de impedir decantação prolongada.

3.4 PRODUÇÃO DE INÓCULO

A fim de se obter o inóculo inicial, realizou-se a transferência de 10 mL de uma cultura estoque (conforme item 3.3) para um Erlenmeyer de 250 mL, com volume útil de 200 mL, cultivados por 6 dias. Após esse período, os cultivos foram repicados para um Erlenmeyer de 2 L, com volume útil de 1,8 L, e cultivados por um período de 12 dias. Para determinar a quantidade de inóculo (mL) necessária aos experimentos, inicialmente foi quantificado o número de células por mililitro de meio

de cultura, utilizando uma Câmara de Neubauer. O total de células encontrado foi, em seguida, extrapolado para um volume total de 1,8 L de meio de cultivo, de modo a obter um número inicial de células de aproximadamente $15 \times 10^5 \text{ cél mL}^{-1}$. Os cultivos foram mantidos sob iluminação de aproximadamente $111,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo 12:12 h e temperatura constante de $23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Os cultivos com volume de 1,8 L tiveram aeração constante realizada por compressor, regulado com fluxo de ar de aproximadamente 1,66 vvm. O esquema geral para produção de inóculo para os cultivos de *D. subspicatus* é apresentado na Figura 2.

FIGURA 2 - PRODUÇÃO DE INÓCULO PARA OS CULTIVOS DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



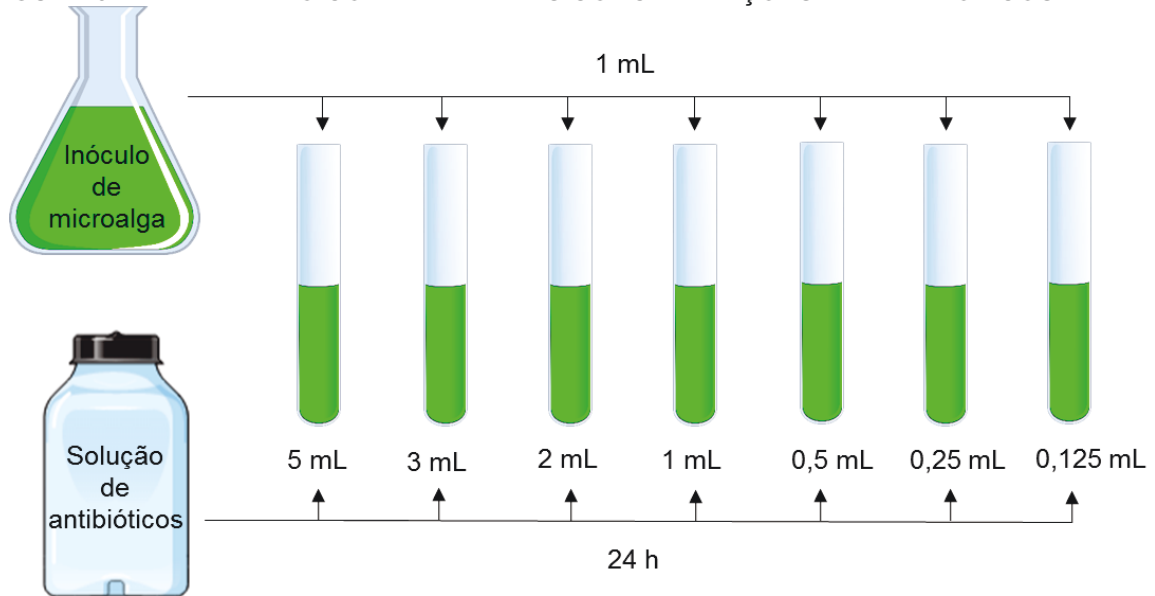
3.5 OBTENÇÃO DA CEPA AXÊNICA

Uma solução estoque de antibióticos foi preparada, dissolvendo-se 100 mg de penicilina G, 50 mg de estreptomicina e 40 mg de nistatina em 100 mL de água ultrapura. Em seguida, a solução foi esterilizada via filtração, utilizando filtro com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$, e armazenada em um frasco estéril.

Alíquotas de 1 mL da cultura de microalgas foram coletadas e transferidas para tubos de ensaios estéreis, que receberam como tratamento doses decrescentes da solução estoque de antibióticos: 5; 3; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 mL

(Figura 3). Os diferentes tratamentos foram mantidos por 24 horas. Posteriormente, cada tratamento seguiu para etapa de esgotamento por estrias.

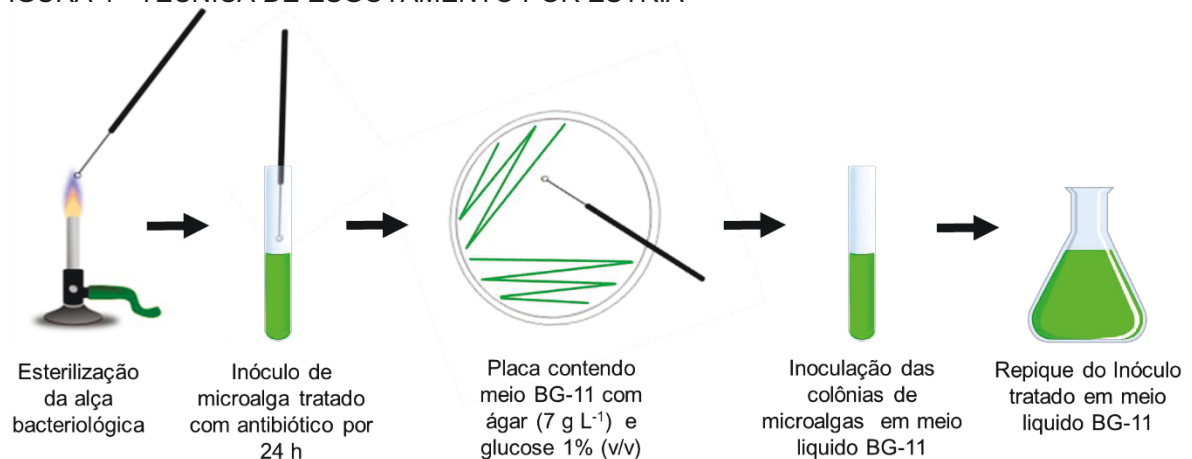
FIGURA 3 - TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS



3.5.1 Esgotamento por Estrias

O esgotamento por estrias foi realizado com o objetivo de isolar a microalga após o tratamento com antibióticos e, assim, obter uma colônia, livre de qualquer outro micro-organismo. Para tal, amostras de colônias de microalgas, derivadas dos tratamentos com antibióticos (item 3.5), foram inoculadas em placas de Petri, contendo meio BG11 com ágar (7 g L^{-1}) e glucose a 1% (v/v), esgotando-se o material por meio de estrias na superfície do meio (Figura 4).

FIGURA 4 - TÉCNICA DE ESGOTAMENTO POR ESTRIA



As placas foram mantidas até crescimento das microalgas. Seguidamente as placas de tratamentos, onde visivelmente observou-se menor crescimento bacteriano, foram repicadas para meio de cultivo líquido estéril e mantidas até que houvesse o crescimento das microalgas isoladas.

3.5.2 Avaliação da Pureza da Cepa Axênica

Após o crescimento das microalgas isoladas em meio líquido, essas foram avaliadas quanto sua pureza. Amostras das cepas isoladas foram inoculadas em placas de Petri, contendo meio BG11 com ágar (7 g L^{-1}) e glucose a 1% (v/v), esgotando-se o material por meio de estrias na superfície do meio. As placas foram mantidas até houvesse o crescimento das microalgas e avaliadas quando ao desenvolvimento de algum micro-organismo contaminante.

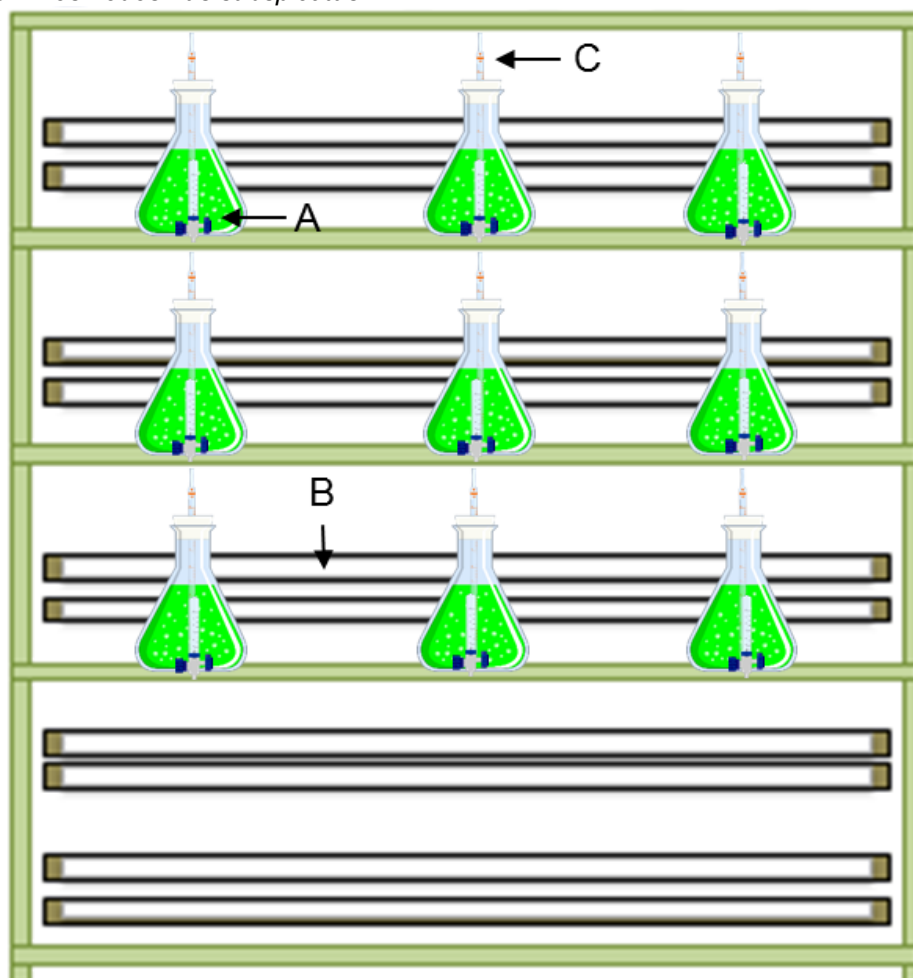
3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO

3.6.1 Cultivos Autotrófico

Os cultivos de microalgas foram realizados em escala laboratorial, conforme Figura 5, em frascos Erlenmeyer com capacidade de 2 L. O volume útil utilizado para cada frasco Erlenmeyer foi de 1,8 L, independentemente do meio de cultivo utilizado (item 3.2).

Todos os cultivos foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura controlada a $23 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, iluminação de aproximadamente $111,5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ obtida por meio de lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo 12:12 h, aeração constante realizada por compressor, regulado com auxílio de um fluxômetro, com fluxo de ar de aproximadamente 1,66 vvm. Todo ar injetado foi tratado através de um filtro coalescente com porosidade de $1 \text{ } \mu\text{m}$. Devido à evaporação da água nos cultivos, diariamente adicionou-se água de osmose reversa estéril para manutenção do nível e evitar a concentração do meio. Os cultivos autotróficos tiveram duração de 12 dias. A biomassa foi então recuperada por centrifugação ($2607 \times g$, 20 min, 4°C) seguida de liofilização.

FIGURA 5 - ARMÁRIO PARA SISTEMA DE CULTIVO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



NOTA: A: Fluxômetro; B: Lâmpadas fluorescentes; C: Entrada de ar comprimido.

3.6.2 Cultivos Mixotróficos

O estudo do crescimento mixotrófico foi realizado, utilizando uma cepa de microalgas livre de contaminações (cepa axênica – item 3.5), culturas sob condições de crescimento autotrófico foram usadas como inóculo inicial (item 3.4). Os cultivos de microalgas foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 2 L. O volume útil utilizado para cada frasco Erlenmeyer foi de 1,8 L, em meio de cultura CHU (adaptado ABNT NBR 12648). Como fonte de carbono usou-se glucose nas concentrações de 1, 5 e 10 g L⁻¹.

Todos os cultivos foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura controlada a 23 °C ± 2 °C, iluminação de aproximadamente 111,5 μmol m⁻² s⁻¹, obtida por meio de lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo 12:12 h,

aeração constante realizada por compressor, regulado com fluxo de ar de aproximadamente 1,66 vvm. Todo ar injetado foi tratado através de um filtro coalescente com porosidade de 1 μm . Os cultivos mixotróficos tiveram duração de 9 dias. A biomassa foi então recuperada por centrifugação (2607 x g, 20 min, 4°C) seguida de liofilização.

3.6.3 Cultivos Heterotróficos

Os cultivos heterotróficos foram realizados utilizando uma cepa de microalgas livre de contaminações (cepa axênica – item 3.5). As culturas sob condições de crescimento autotrófico foram usadas como inóculo inicial (item 3.4). Os cultivos de microalgas foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 1 L. O volume útil utilizado para cada frasco Erlenmeyer foi de 800 mL, em meio de cultura CHU (adaptado ABNT NBR 12648). Como fonte de carbono usou-se glucose nas concentrações de 1, 5 e 10 g L⁻¹.

Os cultivos foram realizados em um shaker horizontal, com ausência total de iluminação, temperatura controlada a 23 °C \pm 2 °C, agitação constante de 160 rpm. Os cultivos heterotróficos tiveram duração de 9 dias. A biomassa foi então recuperada por centrifugação (2607 x g, 20 min, 4°C) seguida de liofilização.

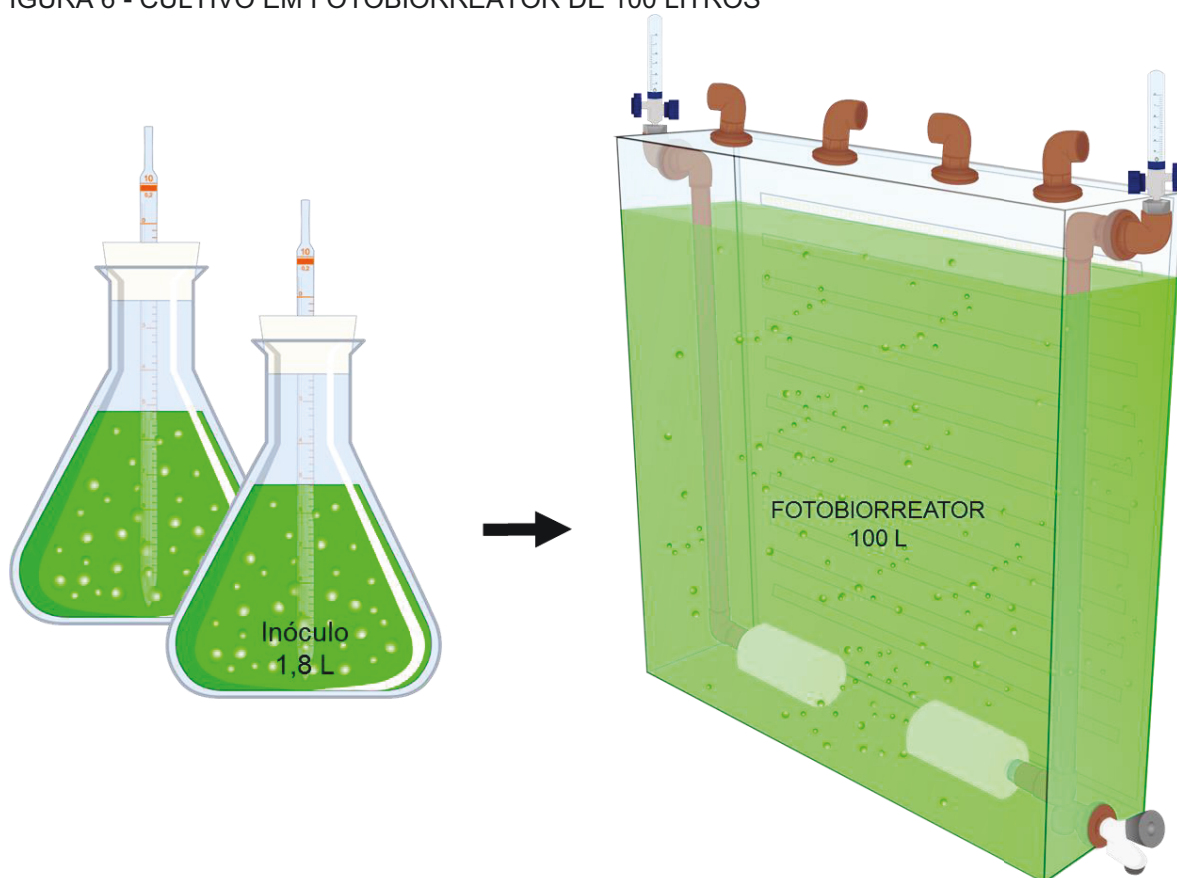
3.6.4 Cultivo em Fotobiorreator (FBR)

O escalonamento do cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* em escala laboratorial para a escala piloto foi realizado através de um fotobiorreator (FBR) de 100 L (Figura 6). Primeiramente foi preparado o inóculo de acordo com a sessão descrita no item 3.4. A água utilizada no FBR, foi submetida a um processo de filtração com elemento filtrante de 5-15 μm , seguida por desinfecção com Hipoclorito de Sódio (5 ppm), por 1 h, e neutralização com Tiosulfato de Sódio (0,02 g L⁻¹).

Posteriormente, o inóculo foi adicionado, contendo um número inicial de células de aproximadamente 15 x 10⁵ cél mL⁻¹. O FBR foi mantido em ambiente com temperatura controlada a 23 °C \pm 2 °C, iluminação de aproximadamente 309,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas *LED (Light Emitting Diode)*, com fotoperíodo 12:12 h, aeração constante realizada por compressor de ar comprimido, regulado com

fluxo de aproximadamente 0,25 vvm. Devido à evaporação da água no FBR, diariamente adicionou-se água de osmose reversa para manutenção do nível e evitar a concentração do meio. O cultivo teve duração de 12 dias. A biomassa foi então recuperada por centrifugação em centrífuga de fluxo contínuo de 100 L h⁻¹ (1500 x g). Após a diminuição do volume, o material foi novamente centrifugado (2607 x g, 20 min, 4°C) seguido de liofilização.

FIGURA 6 - CULTIVO EM FOTOBIOREATOR DE 100 LITROS



3.7 ANÁLISES DOS CULTIVOS

3.7.1 Densidade Celular

A densidade celular (cél mL⁻¹), durante o desenvolvimento dos cultivos, foi determinada a partir da contagem diária das células utilizando microscopia óptica (aumento de 400X) com auxílio de hemocitômetro (câmara de Neubauer) (VEGA, VOLTOLINA, 2007).

3.7.2 Biomassa Seca

A concentração de biomassa seca em (g L^{-1}) dos cultivos foi determinada diariamente, com base na metodologia de sólidos totais, adaptada de APHA (2005). Para eliminar a influência da umidade presente nos papéis de filtro, estes foram previamente secos em estufa a 60°C por aproximadamente 24 horas. Após este procedimento, 25 mL da amostra de cultivo foi filtrada, com auxílio de uma bomba de vácuo, e transferida para estufa a 60°C até massa constante.

A determinação da biomassa seca (g L^{-1}) foi feita através da diferença entre a massa inicial (P_1) e final (P_2) dos papéis filtro conforme a equação 3:

$$B = \frac{(P_2 - P_1)}{V} \quad (1)$$

onde:

B = Biomassa seca (g L^{-1});

P_1 = Massa do papel filtro seco (g);

P_2 = Massa do papel de filtro com biomassa seca;

V = Volume de amostra filtrada (mL).

3.7.3 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

A taxa de crescimento intrínseca é uma medida do número de duplicações que ocorrem por unidade de tempo em uma cultura de crescimento exponencial. A fase exponencial (linha reta) do crescimento foi cuidadosamente determinada e a taxa de crescimento específica foi obtida determinada de acordo com Wood, Everroad, Wingard (2005):

$$r = \frac{\ln(X_f/X_i)}{t_f - t_i} \quad (2)$$

onde:

r = taxa de crescimento intrínseca (dia^{-1});

X_f = densidade celular no final da fase logarítmica (cél mL^{-1});

X_i = densidade celular no início da fase logarítmica (cél mL^{-1});

t_f = dia final da fase logarítmica (dia);

t_i = dia inicial da fase logarítmica (dia).

O tempo necessário para que ocorra uma duplicação da densidade celular é denominado como tempo de duplicação (T_2), calculado pela seguinte fórmula:

$$T_2 = \frac{\ln 2}{r} \quad (3)$$

onde:

T_2 : tempo de duplicação (dia);

r : taxa de crescimento intrínseca (dia^{-1}).

3.7.4 Métodos Colorimétricos

3.7.4.1 Determinação de Carboidratos Totais

Para a dosagem de açúcares totais na biomassa seca (20 mg), foi realizada previamente uma extração ácida com 1 mL de H_2SO_4 a 80% (v/v) por 20 horas (MYKLESTAD; HAUG, 1972). Durante a adição do ácido e nas 4 horas subsequentes, os frascos contendo as amostras foram mantidos em banho de gelo para evitar a carbonização das amostras. Após o período de extração, as amostras foram diluídas em 9 mL de água ultrapura, centrifugadas (2607 x g, 15 min, 4 °C) e os sobrenadantes obtidos submetidos a dosagens de açúcares totais utilizando o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al. 1956). Uma curva-padrão de glucose foi plotada a cada dosagem, com intervalo de detecção entre 10-50 μg , a partir de uma solução 1 mg mL^{-1} do padrão em água destilada.

3.7.4.2 Determinação de Proteínas

Para a dosagem de proteínas na biomassa seca (5 mg), foi previamente realizado uma extração alcalina, adicionando 5 mL de NaOH 0,1 mol L^{-1} , a 100 °C, por 1 hora (VEGA; ESQUIVEL; VOLTOLINA, 2007). Na sequência, os extratos obtidos foram centrifugados (2607 x g, 15 min, 4°C), e os sobrenadantes submetidos a dosagens de proteínas totais de acordo com o método de Lowry et al. (1951). Uma

curva-padrão de albumina soro bovina foi plotada a cada dosagem, com intervalo de detecção entre 10-90 µg, a partir de uma solução 1 mg mL⁻¹ do padrão em água destilada.

3.7.5 Determinação de Lipídios Totais

Para a determinação dos lipídios totais foi utilizada a metodologia de *Bligh e Dyer* adaptada por Rodríguez, Palau, López (2007). As amostras de biomassa seca (50 mg) foram primeiramente extraídas com 3 mL de solução de clorofórmio e metanol 99,8% na proporção de 1:2 (v/v), sonicadas por 15 min, e posteriormente incubadas a 4 °C por 24 h, para favorecer a extração de lipídeos.

Após, as amostras foram novamente sonicadas por 15 min e centrifugadas (2607 x g, 20 min, 4°C.) A fase clorofórmio:metanol foi recuperada e transferida para um tubo de centrífuga. Foram adicionados mais 1,5 mL de solução clorofórmio:metanol à biomassa residual, e a centrifugação foi repetida nas mesmas condições anteriores. A fase clorofórmio:metanol foi então recuperada e transferida para o tubo de centrífuga.

Foi então adicionado 2 mL de água ultrapura e 1 mL de clorofórmio à fase reservada. A mistura foi agitada e centrifugada em 2607 x g por 10 min, e a fase inferior (fase clorofórmica) transferida para um vial previamente pesado. A fase aquosa foi novamente lavada com 1 mL de clorofórmio, agitada e centrifugada nas condições anteriores, e a fase clorofórmica transferida ao vial. O solvente foi evaporado em capela de exaustão até *secura total*. A determinação de lipídios pelo método gravimétrico foi realizada pela diferença entre o peso dos vials com e sem amostra e o percentual foi calculado pela seguinte equação 4:

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{(V_2 - V_1)}{B} \times 100 \quad (4)$$

onde:

V_1 = massa do *vial* vazio (g);

V_2 = massa do *vial* com lipídios (g);

B = biomassa seca (g).

3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para realização das análises de MEV, aproximadamente 5 mL de amostra foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M por 1 h, após a fixação uma pequena alíquota foi filtrada em membrana de polycarbonato (1µm), seguida de lavagem com água ultrapura por 1 h. Após a lavagem, as células foram desidratadas, utilizando concentrações crescentes de etanol P. A. (30%, 40% 50%, 60%, 70%, 90% e 95% v/v) por 10 min em cada concentração, adaptado de Shubert e Wilk-Wozniak (2003). Em seguida as amostras foram saturadas de CO₂ líquido (ponto crítico), metalização com ouro para avaliação sob o microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 LMU, em voltagem 15 kV no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME- UFPR).

3.9 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR (< 1 kDa) DA BIOMASSA MICROALGAL

Foram realizadas extrações aquosas, a partir das biomassas secas da microalga obtida a partir de diferentes meios de cultivo. As biomassas secas foram suspensas em água ultrapura, na concentração 10% (m/v), em seguida foram submetidas a agitação mecânica e temperatura ambiente por 1 h. As amostras foram então centrifugadas a 2607 x g, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi recuperado e as biomassas residuais foram resubmetidas às extrações aquosas (agitação mecânica, 1h). Os sobrenadantes, obtidos a partir das duas extrações aquosas, foram então reunidos e liofilizados, originando as frações EA. Após liofilização as frações EA foram ressuspensas em água ultrapura (10% m/v) e submetidas à diálise em sistema fechado (membrana cut-off de 1 kDa) em água ultrapura, com trocas de água a cada 2 h, por 4 vezes, gerando as frações E (eluído pela diálise) e R (retido pela diálise). As frações E (eluídos) foram utilizadas nos testes biológicos subsequentes

3.10 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.10.1 Cromatografia de Exclusão

Objetivando o fracionamento dos extratos de microalgas, as frações E, obtidas dos cultivos de microalgas em meios WC, CHU e BG11, foram submetidos a cromatografias de exclusão. Os fracionamentos foram realizados em coluna de vidro contendo Bio-Gel P-2 (105 cm x 1,5 cm d.i., limite de exclusão de 100 – 1800 Da), com volume morto (V_0) de 45 mL, volume total (V_t) de 150 mL, sob fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, utilizando água ultrapura como eluente. As frações foram coletadas em tubos de ensaio utilizando coletor de frações programado por volume (3 mL). Os eluatos foram monitorados por dosagens de açúcares totais e proteínas totais (LOWRY et al., 1951; DUBOIS et al., 1956).

3.10.2 Cromatografia de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (UHPLC-MS)

Todas as frações E (eluída) e subtrações obtidas após cromatografia de exclusão foram analisadas por Cromatografia de Ultra Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (UHPLC-MS). Os seus tempos de retenção foram comparados com os de padrões analítico. Cada padrão foi analisado separadamente para determinação do tempo de retenção individual. Uma curva de calibração foi gerada a partir de soluções padrão, para cada molécula.

As amostras e os padrões de fitormônios N6-benziladenina (BA), N6-benziladenosina (BAR), dihidrozeatina (DZ), dihidrozeatina ribosídeo (DZR), N6-isopenteniladenina (iP), cinetina (K), cinetina ribosídeo (KR), *trans*-zeatina (tZ), *trans*-zeatina ribosídeo (ZR), (+,-) -*cis,trans*-ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (AIA) e ácido giberélico (GA3) (adquiridos da empresa OlChemIm - República Tcheca), foram solubilizados em água ultrapura e metanol 99,9%, em proporção de 70:20 (v/v), previamente filtrados em unidades filtrantes com poro de $0,22 \mu\text{m}$.

Os solventes utilizados na fase móvel foram, ácido fórmico 85%, acetonitrila 99,9% e água ultrapura. A fase móvel consistiu de dois solventes: A e B. O solvente A consistiu de 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila e o solvente B consistiu de 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura.

A análise de cromatografia líquida foi realizada em um UHPLC Waters, equipado com coluna cromatográfica Ascentis® C18 (15 cm x 2,1 mm), com tamanho de partícula de $3 \mu\text{m}$, utilizando os seguintes parâmetros cromatográficos: Volume

de injeção: 10 μL ; Fluxo: 0,4 mL min^{-1} ; temperatura 40 $^{\circ}\text{C}$ e fase móvel com gradiente de solventes A e B (Tabela 6).

TABELA 6- GRADIENTES DA FASE MÓVEL

Tempo (min)	Solvente A ^a (%)	Solvente B ^b (%)
0:01	3	97
8:00	30	70
10:00	50	50
14:10	80	20
20:00 ^c	3	97

NOTA: ^a Solvente A: 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila; ^b Solvente B: 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura; ^c Tempo total da cromatografia.

O equipamento de UHPLC é acoplado a um espectrômetro de massas Xevo® G2-S QToF, sendo a fonte de ionização por eletrodispersão (eletrospray) e o gás nebulizador nitrogênio. A pressão do gás nebulizador, a temperatura do gás e a voltagem utilizada foram 4,0 Bar, 200 $^{\circ}\text{C}$ e 10,0 eV, respectivamente.

3.11 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.11.1 Ressonância Magnética Nuclear Monodimensional (^1H , ^{13}C) e bidimensional (HSQC)

As análises por ressonância magnética nuclear (RMN) mono e bidimensionais, foram obtidas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, com uma sonda de 5 mm (*widebore probe*), nas frequências bases de 400 MHz (^{13}C) e 600 MHz (^1H), em temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$.

Todas as frações E e subtrações obtidas após cromatografia de exclusão foram liofilizadas e solubilizadas em água deuterada (D_2O , 99 %), em concentração de 80 mg mL^{-1} para as análises de ^{13}C , e 20 mg mL^{-1} para as análises de ^1H . Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ^{13}C (30,2 ppm) como para ^1H (2,224 ppm).

3.12 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS

As análises termogravimétricas foram utilizadas para avaliação da perda de massa, em razão do aumento de temperatura, dos compostos presentes nas biomassas microalgais brutas de todos os cultivos, biomassas residuais dos extratos aquosos, extratos lipídicos, extratos aquosos e frações E dos cultivos autotróficos. Os ensaios de TGA foram realizados em equipamento de análise térmica simultânea, STA 449 NETZSCH. As amostras (5 mg) foram aquecidas em cadinho de alumina (Al_2O_3), entre 25 – 800 °C, com taxa constante de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio.

3.13 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL

3.13.1 Cultivo *in vitro* de Explante de Cenoura

3.13.1.1 Desinfestação

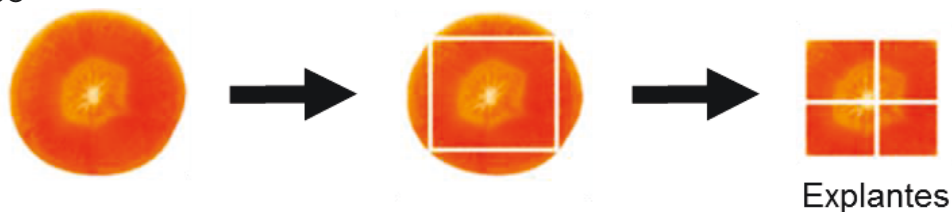
Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal, localizado no Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

Primeiramente, foi realizada uma desinfestação das cenouras (*Daucus carota*), através de lavagens em água corrente e detergente comercial. Em seguida, a cenoura foi cortada em rodela, de cerca de 0,5 cm de espessura, e imersas em uma solução com etanol 70%, durante 1 min. Após esse tempo, as rodela foram retiradas e imersas em solução de Hipoclorito de Sódio 5% acrescido de Tween 20 0,1%, durante 20 min sob agitação. Ao final desse processo, os pedaços de cenoura foram lavados com água ultrapura estéril, por seis vezes.

3.13.1.2 Obtenção dos Explantes

Em condições assépticas, as rodela de cenouras foram transferidas para uma placa de Petri estéril, e com um auxílio de um bisturi estéril foram desprezadas as extremidades que estiveram em contato com as soluções de desinfestação (Figura 7).

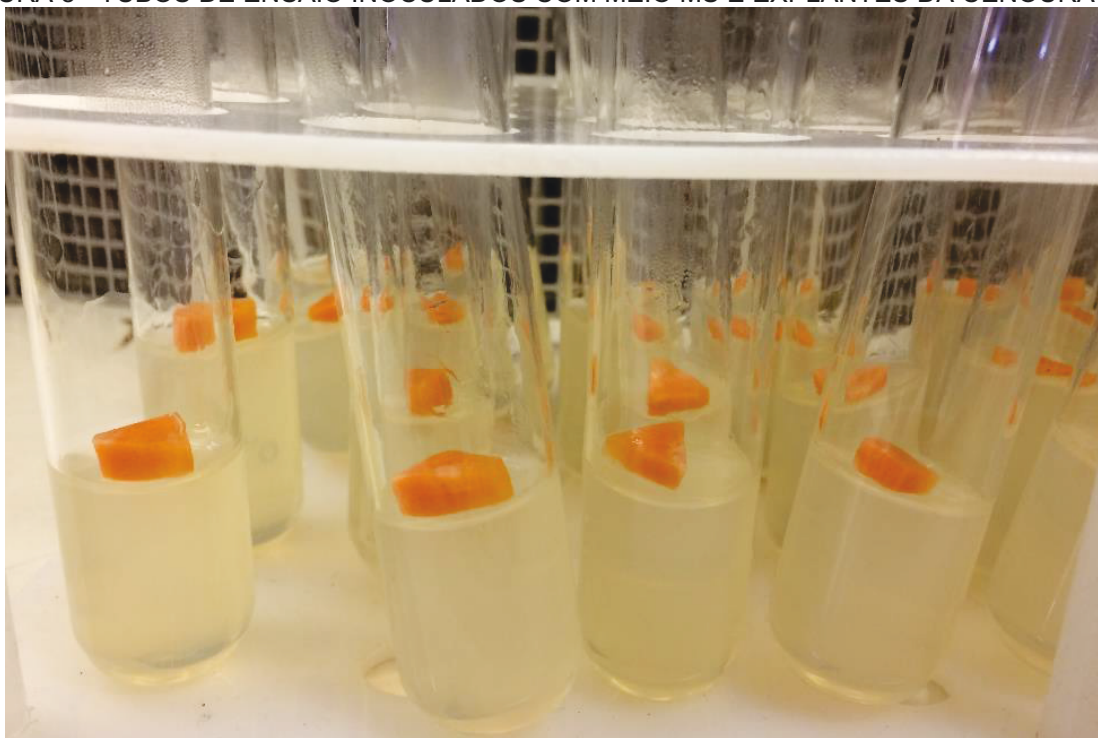
FIGURA 7 - ESQUEMA DE CORTE DO EXPLANTE DA CENOURA UTILIZADO NO TESTE BIOLÓGICO



3.13.1.3 Incubação

Após o processo de obtenção dos explantes, os mesmos foram imediatamente inoculados em meio solidificado, como mostra a Figura 8, com auxílio de uma pinça estéril, em tubos contendo meio Murashige e Skoog (MS) (TOSHIO; SKOOG, 1962) (Tabela 7).

FIGURA 8 - TUBOS DE ENSAIO INOCULADOS COM MEIO MS E EXPLANTES DA CENOURA



O meio teve seu pH inicial ajustado para 5,8, adicionados de fração E, obtida a partir de cultivo autotrófico em meio BG11 (STANIER et al., 1971) (item 3.9), nas concentrações 0,1; 0,5; 1; e 2 g L⁻¹, meio MS sem adição da fração E foi utilizado como controle.

TABELA 7- COMPOSIÇÃO DO MEIO MURASHIGE E SKOOG (MS)

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g L ⁻¹)
MACRONUTRIENTES	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4.10 ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,7.10 ⁻¹
KI	8,3.10 ⁻⁴
NH ₄ NO ₃	1,65.10 ⁰
KNO ₃	1,9.10 ⁰
MICRONUTRIENTES	
H ₃ BO ₃	6,2.10 ⁻³
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5.10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA	3,73.10 ⁻²
Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	2,5.10 ⁻⁴
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5.10 ⁻⁵
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7.10 ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	2,23.10 ⁻²
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6.10 ⁻³
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78.10 ⁻²
VITAMINAS	
Ácido Nicotínico	5.10 ⁻⁴
Glicina	2.10 ⁻³
Piridoxina HCl	5.10 ⁻⁴
Tiamina HCl	1.10 ⁻⁴
OUTROS	
Ágar	1.10 ¹
Mio-inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1.10 ⁻¹
Sacarose	3.10 ¹

FONTE: Toshio e Skoog (1962).

Os explantes da cenoura foram mantidos a 25 °C, no escuro por um período de 30 dias. Após os explantes tratados com os extratos microalgais foram submetidos a análises qualitativas quando ao desenvolvimento de calos.

3.13.2 Bioensaios com Sementes de Tomate

Os bioensaios foram realizados no departamento de Bioquímica da UFPR – Setor de Ciências Biológicas. Sementes de tomate (*Solanum Lycopersicon*, cultivar Santa Clara) foram distribuídas em caixas GERBOX, forradas com papel filtro. Os

filtros foram previamente embebidos em soluções de frações E, obtidas a partir de cultivos autotróficos em meios WC, CHU e BG11 (item 3.9), nas concentrações 0,1; 0,5; 1; e 2 g L⁻¹. Produto comercial ACADIAN™ (extrato de macroalga), na concentração de 2 mL L⁻¹, foi utilizado como controle positivo e água ultrapura como controle negativo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, totalizando 6 tratamentos, realizado em quadruplicata para cada tratamento, sendo que cada repetição constitui-se de Gerbox com 20 sementes.

Após 14 dias, em uma câmara vertical incubadora - BOD (*Biochemical Oxygen Demand* – Demanda Bioquímica de Oxigênio) com temperatura média de 25 °C e desprovidos de luz, foram avaliados o número de sementes germinadas (%), o comprimento (cm) e o volume (cm³) dos hipocótilos, através do programa computacional Win Rhizo® acoplado a Scanner.

3.13.3 Bioensaios com Milho

3.13.3.1 Desinfestação das Sementes

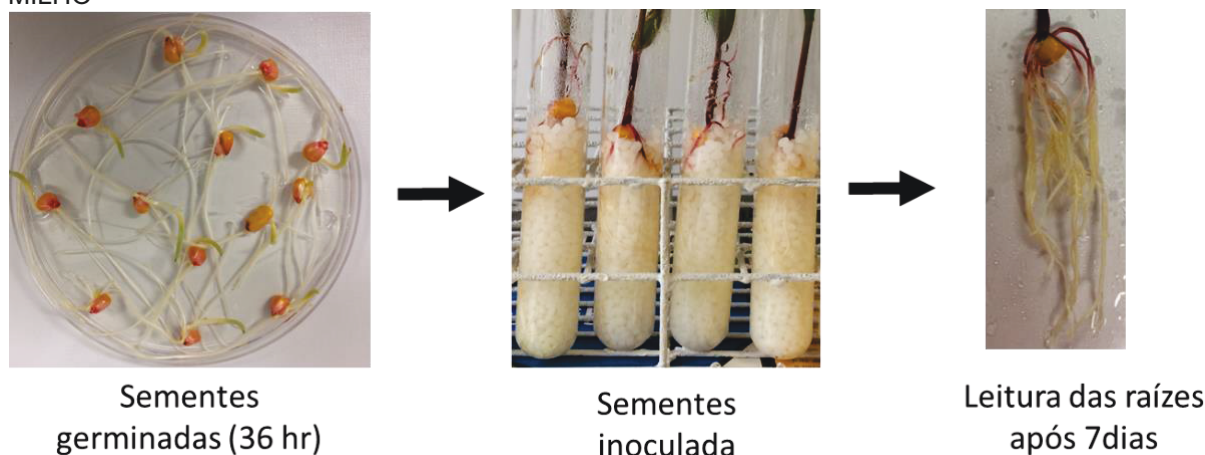
Inicialmente as sementes de milho (*Zea mays* L.) foram imersas em etanol 70% por 5 minutos na proporção de 1 mL por semente. Em seguida, o etanol foi dispensado e as sementes foram imersas em uma solução de Hipoclorito de Sódio 1%, Tween 20 0,04% e água destilada estéril por 20 minutos, na proporção de 1 mL por semente. As sementes foram então lavadas quatro vezes em água destilada estéril e colocadas para germinar em placas de Ágar-ágar 0,8% por 48 horas em estufa com temperatura a 30 °C.

3.13.3.2 Incubação

As sementes de milho pré-germinadas foram colocadas em tubos contendo aproximadamente 25 g de esferas de polipropileno. Imediatamente após o plantio, as sementes pré-germinadas foram inoculadas soluções de frações E (item 3.9), obtidas a partir de cultivo em fotobiorreator em meio CHU (item 3.9), nas concentrações 0,1; 0,5; 1; e 2 g L⁻¹. Produto comercial ACADIAN™ (extrato de macroalga), na concentração de 1 mL L⁻¹, e Plant Medium (EGENER; HUREK;

HUREK, 1999) foram utilizados como controles positivos. Água purificada foi utilizada como controle negativo (Figura 9).

FIGURA 9 – ESQUEMA SIMPLES DO PROCESSO PARA REALIZAÇÃO DO BIOENSAIO EM MILHO



As plantas foram cultivadas por 7 dias em câmara climática de alta precisão, com temperatura a 28 °C, umidade relativa de 70%, fotoperíodo 16:8 h (claro: escuro) e intensidade luminosa de 197 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com o objetivo de reduzir a influência de fatores ambientais. Após esse período, foram avaliados o comprimento (cm) e o volume (cm^3) da raiz, através do programa computacional Win Rhizo® acoplado a *Scanner*.

3.14 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

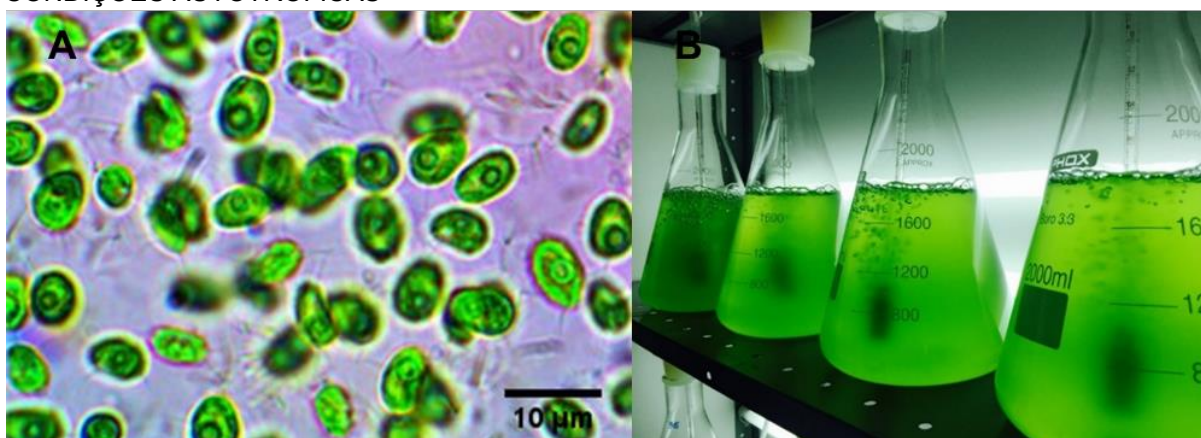
Todos os experimentos realizados neste trabalho foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Para os ensaios biológicos a análise de ANOVA foi precedida por teste de Ryan-Joiner, Bartlett e Levene, utilizado o software Minitab 18, versão gratuita. Diferenças entre médias foram determinadas usando teste de *Tukey*. Dados com *p* valor menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todos os gráficos foram gerados a partir do software GraphPad Prism 5 (version 5.03, GraphPad Software Inc, 2010, San Diego, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DO CULTIVO AUTOTRÓFICO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Objetivando analisar o efeito de diferentes meios de cultura sobre a produção de biomassa, morfologia celular e atividade bioestimulante vegetal da microalga *Desmodesmus subspicatus*, a mesma foi cultivada autotroficamente (Figura 10) em três meios diferentes: WC, CHU e BG11.

FIGURA 10 - MICROSCOPIA E CULTIVOS DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS



NOTA: A: microscopia óptica com aumento de 1000x; B: Cultivos em Erlenmeyer de 2L

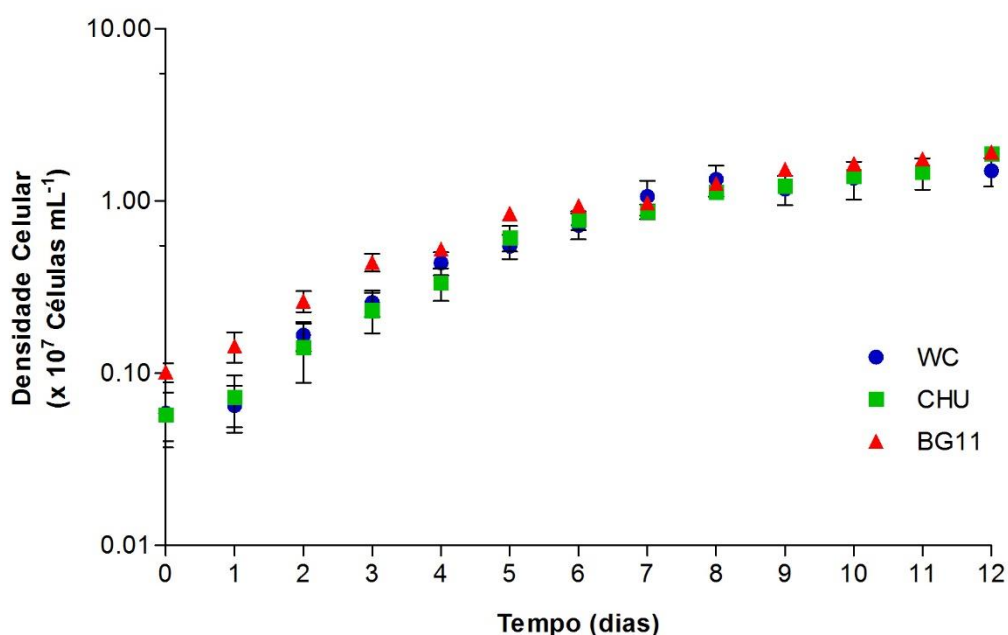
4.1.1 Análise da Cinética de Crescimento de *Desmodesmus subspicatus*

Na Figura 11 encontram-se os perfis cinéticos de *D. subspicatus* construídos com os valores de densidade celular diária. Todos os cultivos, independentemente do meio, foram inoculados com o mesmo volume de inóculo microalgal (200 mL) e conduzidos simultaneamente por 12 dias.

Os resultados obtidos evidenciam comportamento semelhante para todas as curvas de crescimento. As microalgas apresentaram uma fase lag de um dia, período este de adaptação aos meios, onde ocorre pouca ou nenhuma divisão celular. Durante esta fase, a cultura microalgal se encontra em alta atividade metabólica, elevando os níveis de enzimas e metabólicos envolvidos na divisão celular e fixação de carbono (BARSANTI; GUALTIERI, 2014). Entre o segundo e quinto dia, observou-se a fase exponencial ou de crescimento, período onde a

densidade celular aumenta constantemente em função do tempo. Quando um ou mais componentes do meio se tornam limitantes para a atividade celular, a fase exponencial acaba e inicia-se um crescimento com taxas mais reduzidas, muitas vezes viabilizado pelo consumo de reservas celulares endógenas (LEE; SHEN, 2004; LOURENÇO, 2006). Após o quinto dia de cultivo, as microalgas entraram em fase desaceleração. Nesta fase, fatores limitantes como redução da atividade fotossintética, decorrente do incremento da densidade celular e consequente auto-sombreamento, e principalmente, redução da disponibilidade de nutrientes essenciais no meio, acabam ocasionando uma redução na taxa de crescimento celular (LEE; SHEN, 2004). Não foi possível observar fase estacionária nos perfis cinéticos de *D. subspicatus* obtidos, independentemente do meio de cultura utilizado.

FIGURA 11 – PERFIL CINÉTICO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO



NOTA: Resultados foram expresso como média \pm DP ($n = 9$), e comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Cultivos tiveram duração de 12 dias.

A densidade celular máxima, para *D. subspicatus*, foi de $1,93 \times 10^7$ cél mL⁻¹, alcançada ao fim do 12º dia de cultivo com o meio BG11 (Tabela 8). No entanto, densidades celulares semelhantes foram obtidas com os meios CHU e WC, atingindo um total de $1,89 \times 10^7$ cél mL⁻¹ e $1,69 \times 10^7$ cél mL⁻¹, respectivamente. Não foi observada diferença significativa quando as densidades celulares finais foram comparadas estatisticamente.

Parâmetros cinéticos foram calculados na fase exponencial de crescimento, entre os dias 2 e 5 (Tabela 8). Semelhantes taxas de crescimento intrínseca (r) foram atingidas para os meios WC, CHU e BG11, sendo $0,45 \text{ d}^{-1}$, $0,47 \text{ d}^{-1}$ e $0,42 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Quando assume-se uma taxa de mortalidade igual a zero, a taxa de crescimento intrínseco (r) será igual a velocidade específica de crescimento (μ), assim podemos dizer que as velocidades específicas de crescimento variaram entre $0,42 - 0,47 \text{ d}^{-1}$.

Nesse estudo ao analisar a divisão celular ou tempo de duplicação (T_2), o menor tempo foi para o meio CHU com 1,7 dias, ou seja, durante o crescimento linear na fase exponencial a microalga demandou aproximadamente 41 h para dobrar a densidade celular. Para os meios BG11 e WC, o tempo de duplicação foi de 2,0 e 2,7 dias correspondente a 48 e 64 h.

TABELA 8 - PARÂMETROS CINÉTICOS PARA O CRESCIMENTO DE *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

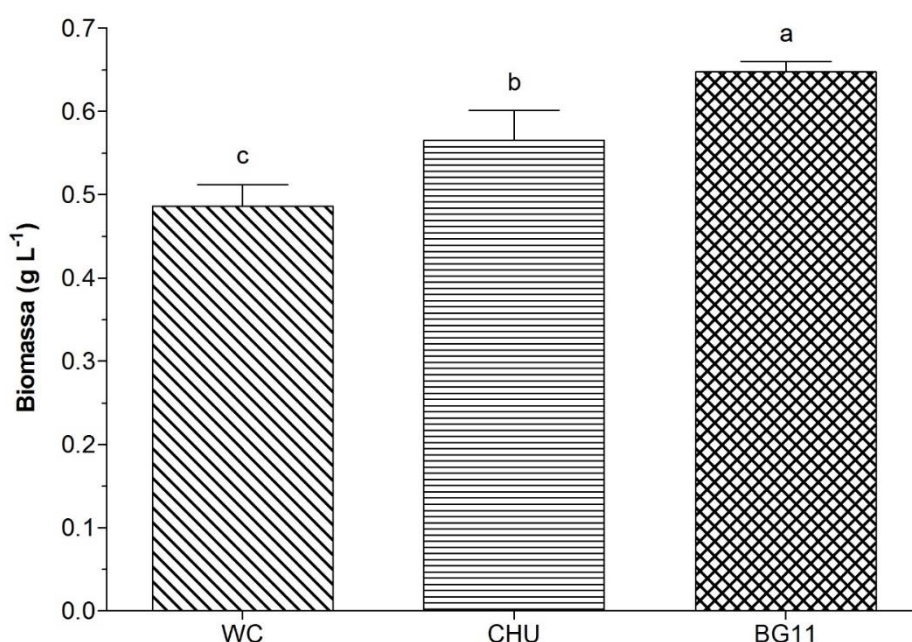
Meio de Cultivo	Densidade celular final (cél mL ⁻¹)	Taxa de crescimento intrínseca r (dia ⁻¹) ^A	Tempo de duplicação T_2 (dia)
WC	$1,69 \times 10^7$ ^a	0,45	2,7
CHU	$1,89 \times 10^7$ ^a	0,47	1,7
BG11	$1,93 \times 10^7$ ^a	0,42	2,0

NOTA: ^A Assumindo crescimento exponencial e zero mortalidade, a taxa de crescimento intrínseco (r) será igual a velocidade específica de crescimento (μ). ^a Resultados foram expresso como média \pm DP ($n = 3$), e comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Cultivos tiveram duração de 12 dias.

Os resultados alcançados neste trabalho estão de acordo com estudos reportados na literatura. Rossi (2013), ao cultivar *Desmodesmus* sp. sob diferentes intensidades luminosas em meio WC, atingiu velocidade específica máxima de crescimento entre $0,35$ a $0,56 \text{ d}^{-1}$. Hakalin (2014), durante processo de otimização obteve com *Scenedesmus* sp., cultivada em meio ASM1 por 10 dias, densidade celular de $1,47 \times 10^6$ cél mL⁻¹ e $1,34 \times 10^6$ cél mL⁻¹, taxa de crescimento intrínseca entre $0,24 - 0,52 \text{ d}^{-1}$, com tempo de divisão celular entre $1,2 - 2,9$ dias. Após otimização, a densidade celular máxima passou para $1,3 \times 10^7$ cél mL⁻¹, com taxa de crescimento de $0,47 \text{ d}^{-1}$. Krettle (2015) obteve uma densidade celular máxima de $8,26 \times 10^6$ cél mL⁻¹ ao cultivar a microalga *Scenedesmus acuminatus* em meio ASM1 durante 24 dias.

Na Figura 12 é possível observar a produção de biomassa da microalga *D. subspicatus*. A produção máxima de biomassa foi obtida com o meio de cultivo BG11, com uma produção de $0,65 \text{ g L}^{-1}$, seguida pelos meios CHU e WC, com produções de $0,56 \text{ g L}^{-1}$ e $0,48 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Esses dados corroboram com os valores de densidade celular apresentados.

FIGURA 12 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO



NOTA: Resultados foram expresso como média \pm DP ($n = 9$), e comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Cultivos tiveram duração de 12 dias.

Entre as diferenças na composição dos meios de cultivo utilizados e que afetam diretamente a produção de biomassa, uma das mais relevantes é representada pelo teor de nitrogênio em virtude do seu papel biológico no ciclo de vida das microalgas. São reportados na literatura correlações positivas e negativas relacionadas à abundância e deficiência deste elemento no meio de cultura. Conteúdos elevados de nitrogênio estão correlacionados ao aumento do crescimento e da quantidade de proteínas e clorofilas nas células, e sua carência tende a diminuir as taxas de crescimento celular e elevar a quantidade de carboidratos e lipídios (HU, 2003; SAFAFAR et al., 2016). A quantidade de nitrogênio presente nos meios WC e CHU, $0,08 \text{ g L}^{-1}$ e $0,25 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, são 94,7 e 83,3% menores do que no meio BG11 com $1,5 \text{ g L}^{-1}$. Deste modo, fica evidente que as variações das concentrações de nitrato dos meios influenciaram de

modo significativo na produção de biomassa, atuando como fator limitante para produção de biomassa nos meios WC e CHU, e estimulando a produção de biomassa no meio BG11.

Concentrações de biomassa microalgal similares as alcançadas com os diferentes meios de cultivo nesse trabalho já foram reportadas na literatura. Ji et al., (2013) atingiram $0,76 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa quando cultivou *Desmodesmus* sp. em meio BG11, com volume de 100 mL, pH 7,0, $30 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo 14:10 (claro:escuro), durante 14 dias. Em outro estudo, Ji et al., (2014) ao cultivar *Desmodesmus* sp., obtiveram $0,41 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca, cultivada autotroficamente por 14 dias em meio BG11, pH 7,0, $24 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo 15:9 (claro:escuro) e adição de 10% de CO_2 .

Chaichalerm et al. (2012), ao cultivarem a microalga *Scenedesmus acutus* durante 15 dias, em meio BG11, com volume de 500 mL, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo 12:12 (claro:escuro), injeção de ar de 1 vvm, obtiveram produção de $0,82 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca. Samori et al., (2013) obteve uma produção $0,48 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa ao cultivar *Desmodesmus communis* por 22 dias, em meio CHU13 modificado, com volume de 1 L, temperatura ambiente $18 - 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $440 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo 16:8 (claro:escuro) e injeção de ar com 0,14 vvm.

4.1.2 Composição da Biomassa Seca

Análises bioquímicas foram realizadas objetivando verificar possíveis mudanças na composição da biomassa microalgal, quando cultivada autotroficamente em diferentes meios de cultivo. Estes resultados estão representados na Tabela 9. A composição bioquímica da biomassa de microalgas é diversificada e contém três componentes principais: proteínas, carboidratos e lipídios. A produção desses compostos está diretamente relacionada ao gênero e espécie, bem como a fase de crescimento, condições de cultivo e meio de cultura utilizados (BROWN, 1991; MIAO; WU, 2004; LI et al., 2010).

Observa-se que para a biomassa da microalga *D. subspicatus* os carboidratos se apresentam como componente majoritário quando cultivada nos meios WC e CHU, atingindo teores de 37,8 e 31,9%, respectivamente. A biomassa microalgal obtida com o meio BG11 atingiu um conteúdo de carboidratos totais de

17,2%, valor que representa aproximadamente metade do percentual atingido com meios WC e CHU.

TABELA 9 – COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

CULTIVO AUTOTRÓFICO	CARBOIDRATOS (%)	PROTEÍNAS (%)	LIPÍDIOS (%)	CINZAS* (%)
Meio WC	37,8 ± 0,79 ^a	7,4 ± 0,98 ^a	25,7 ± 0,64 ^a	7,5 ± 0,02 ^a
Meio CHU	31,9 ± 1,39 ^a	13,4 ± 0,47 ^b	7,9 ± 0,89 ^b	16,6 ± 0,04 ^b
Meio BG11	17,2 ± 0,82 ^b	14,4 ± 0,53 ^b	9,5 ± 0,96 ^b	23,5 ± 0,04 ^c

NOTA: Resultados foram expresso como média ± DP (n = 3), e comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)*. Valores obtidos por análise termogravimétrica. Cultivos tiveram duração de 12 dias.

Esse resultado está diretamente relacionado com os teores de nitrogênio contido nos meios CHU e WC, os quais possuem em sua formulação 83,3 e 94,7% menos que o meio BG11. Algumas microalgas aumentam os teores de carboidratos no interior de suas células quando o meio de cultivo possui limitação de nitrogênio (DRAGONE et al., 2011).

A espécie *Desmodesmus communis*, estudada por Samorì; Samorì; Pistocchi (2014), apresentou teores de carboidratos em sua biomassa entre 16,9 – 57,2%, ao utilizar efluente como meio de cultivo. Estudo realizado por Markou; Iconomou; Muyllaert (2016) com *Desmodesmus* sp., cultivada em meio BBM, demonstrou uma quantidade de 25,4% de carboidratos na biomassa microalgal seca. Ho, Chen e Chang (2012) observou que a microalga *Scenedesmus obliquus*, cultivada em meio BG11, continha 16,6% de carboidratos em sua composição.

O segundo componente da biomassa microalgal mais presente, variou conforme o meio utilizado. Os teores de proteínas para os meios CHU e BG11 foram de 13,4 e 14,4%, respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre si. Baixo teor de proteínas foi obtido com o meio WC (7,4%), que possui 94,7% a menos de fonte de nitrogênio quando comparado ao meio BG11 e 68% quando comparado com o meio CHU, confirmando-se assim, que a escassez na fonte de nitrogênio reflete-se diretamente na produção de proteínas (BOUGARAN; BERNARD; SCIANDRA, 2010). De acordo com a espécie, os valores de proteínas em microalgas podem variar entre 6 – 71% (BECKER, 2007). Duong et al. (2015), cultivaram em meio BBM, diferentes espécies de microalgas, obteve teores de

proteínas de 33,08% para *Scenedesmus* sp, 22,66% para *Scenedesmus dimorphus* e 16,0% para *Chlorella* sp.

D. subspicatus quando cultivada no meio WC foi capaz de acumular um teor de lipídios de 25,7%. Este resultado é 2 e 3 vezes maior quando comparado as produções obtidas com os meios CHU e BG11 (7,9 e 9,5%, respectivamente), os quais não apresentaram diferenças significativas entre si. Lipídios e carboidratos representam a forma preferível de armazenamento de energia das microalgas quando a fonte de nitrogênio é escassa (MANDAL; MALLICK, 2009; LIRA, 2011), o que justifica o aumento desses compostos no meio de cultivo WC, corroborando com os demais resultados apresentados para a composição da biomassa microalgal.

Os teores de lipídeos encontrados estão em acordo com diferentes estudos reportados anteriormente. Gressler et al. (2014) obtiveram teores de lipídios totais, na biomassa seca da *D. subspicatus*, de 12 e 18% para cultivo sem e com adição de CO₂ respectivamente. Sriram e Seenivasan (2015) reportaram teores de lipídios entre 8 – 17,5% para *Desmodesmus* sp., cultivada em meio BBM. Os resultados obtidos por Ho, Chen, Chang (2012) apresentaram teores entre 8,3 – 11,7% para *S. obliquus* em condições de cultivo otimizadas com meio DM modificado.

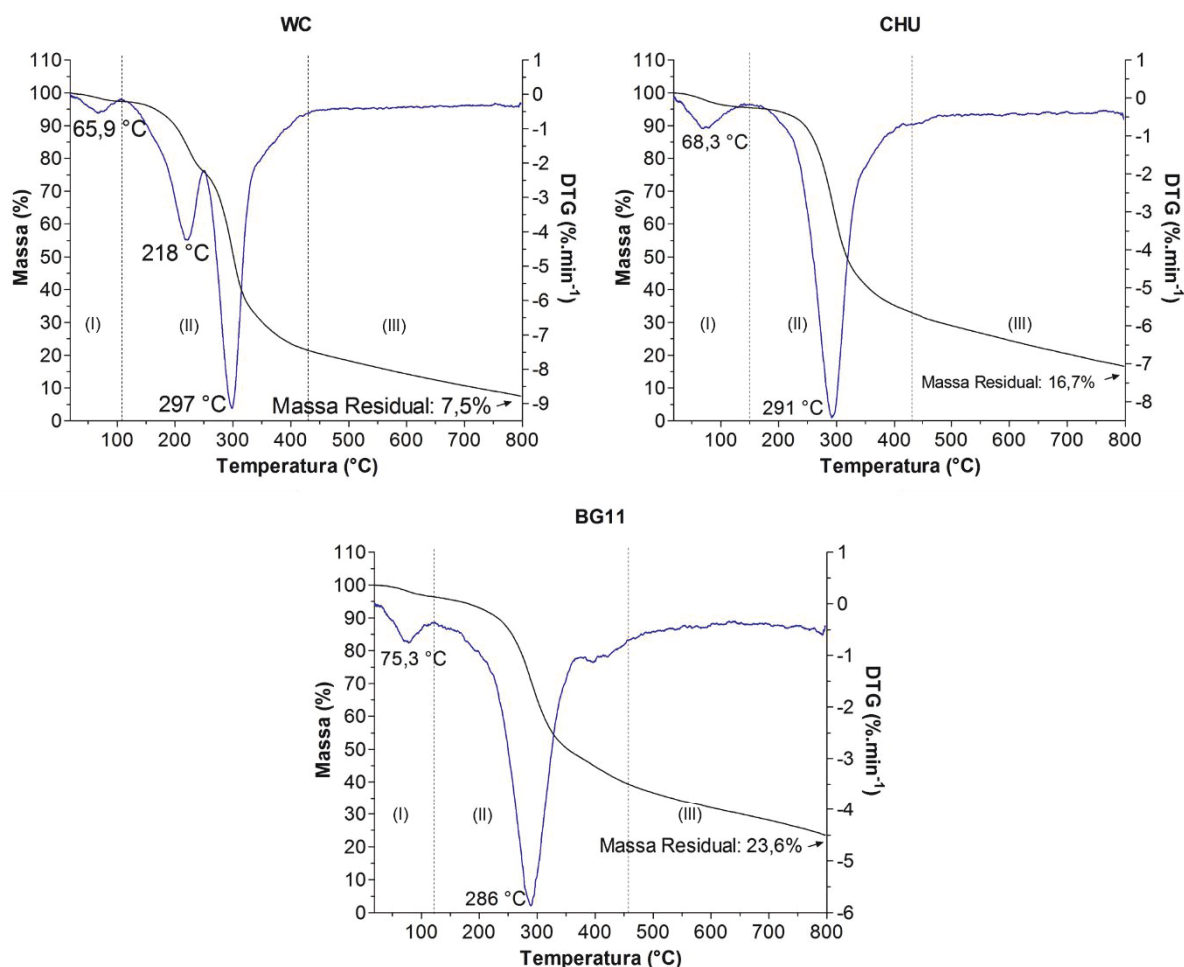
Os valores de cinzas, obtidos com os meios WC, CHU e BG11 foram 7,5; 16,7 e 23,6% respectivamente. Valor semelhante foi encontrado em *Desmodesmus communis*, com teor de cinzas de 19,7% (CONTI et al., 2016). Knoshaug et al. (2016) encontrou um teor cinzas em *Desmodesmus* sp. entre 19,4 e 22,1%. Zamalloa, Boon, Verstraete (2012) e Harman-Ware et al. (2013) encontraram teores de cinzas de 31,2 e 35,2% para as microalgas *S. obliquus* e para *Scenedesmus* sp., respectivamente. Esses valores podem variar entre 6 – 40% de acordo com a espécie cultivada, representando todo o material inorgânico presente na célula (RENAUD; THINH; PARRY, 1999; KASSIM et al., 2014; LÓPEZ-GONZÁLEZ et al., 2014). Alguns gêneros de microalgas possuem a capacidade de acumular diversas substâncias inorgânicas no interior da célula. Essas substâncias podem variar entre macro e micronutrientes, influenciando diretamente nos teores de cinzas obtidos (LIU, 2017).

4.1.3 Análise Termogravimétrica da Biomassa Microalgal Bruta e Extratos Lipídicos dos Cultivos Autotróficos

A termogravimetria avalia as mudanças de massa devido a interação com a atmosfera, vaporização e decomposição, fornecendo uma curva de variação da perda de massa da amostra em função do tempo e temperatura. As análises termogravimétricas foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio em temperatura controlada (25 – 800°C) e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

A Figura 13 mostra o perfil de degradação térmica (termograma) da biomassa da microalga *D. subspicatus*, cultivada nos meios WC, CHU e BG11. De acordo com as curvas termogravimétricas (TG) e suas derivadas correspondentes (DTG) é possível observar que as amostras apresentaram comportamentos semelhantes no que diz respeito à perda de massa, revelando três etapas distintas de degradação.

FIGURA 13 – TERMOGRAMAS DAS BIOMASSAS MICROALGAIS BRUTAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS (TG —; DTG —)



A primeira etapa (I) de degradação ocorreu entre 22,5 – 103 °C (WC), 21,3 – 150 °C (CHU) e 23,1 – 120 °C (BG11), onde foi possível observar pequenas perdas de massa, correspondendo à 2,5; 4,3 e 3,7% respectivamente. Essas pequenas perdas, nessa primeira etapa, estão relacionadas com a remoção de umidade presentes nas células de microalgas (PENG; WU; TU, 2001; PHUKAN et al., 2011).

A segunda etapa (II) de degradação, correspondente a maior parte do processo degradação, ocorreu entre 107 – 436 °C (WC), 153 – 439 °C (CHU) e 122 – 454 °C (BG11). Esta fase é caracterizada por uma grande perda de massa nas amostras de biomassa WC, CHU e BG11, correspondendo à 76,6; 62,7 e 57,5%, respectivamente. A maior parte dos materiais orgânicos, como carboidratos, proteínas e lipídios, é decomposta nessa fase, podendo representar mais de 50% do peso total da amostra (SHUPING et al., 2010; RAHEEM et al., 2015). Como apresentado no item 4.1.2 as biomassas de WC, CHU e BG11 são compostas de carboidratos (37,8; 31,9 e 17,2%, respectivamente), proteínas (7,4; 13,4 e 14,4%, respectivamente) e lipídios (25,7; 7,9 e 9,5%, respectivamente).

Para a amostra WC, foi observado dois eventos principais nessa fase, em 218 e 297 °C. Wang et al. (2006) encontrou termogramas com dois eventos máximos no segundo estágio de degradação, em 223,78 e 310,93 °C para a macroalga *Grateloupia filicina*. Em comparação as demais biomassas macroalgas analisadas, os autores sugerem que diferenças na composição das algas influenciaram diretamente na estabilidade térmica dessas biomassas. Sanches-Silva et al. (2012) analisou a pirólise da microalga *Nannochloropsis gaditana*. Os termogramas obtidos evidenciam um segundo estágio de degradação entre 160 – 450 °C, com evento principal contendo três ombros, um primeiro ombro em baixa temperatura (180 °C), associado à degradação de proteínas e polissacarídeos solúveis enquanto os ombros de temperatura mais elevada (271 e 411 °C) foram associados à degradação da celulose bruta na parede celular, outros polissacarídeos insolúveis e lipídios brutos.

Para as amostras CHU e BG11 observa-se apenas um único evento nessa segunda etapa, em 291 e 286 °C, respectivamente. Evento similar foi evidenciado por Kassim et al. (2014), no qual o estágio de segunda etapa de degradação ocorreu entre 156 – 475 °C para a biomassa de *Chlorella* sp. e 188 – 511 °C para *Tetraselmis suecica*, apresentando um evento principal com máximo de degradação em 290 e 287 °C, respectivamente. O mesmo foi observado por Batista et al. (2013)

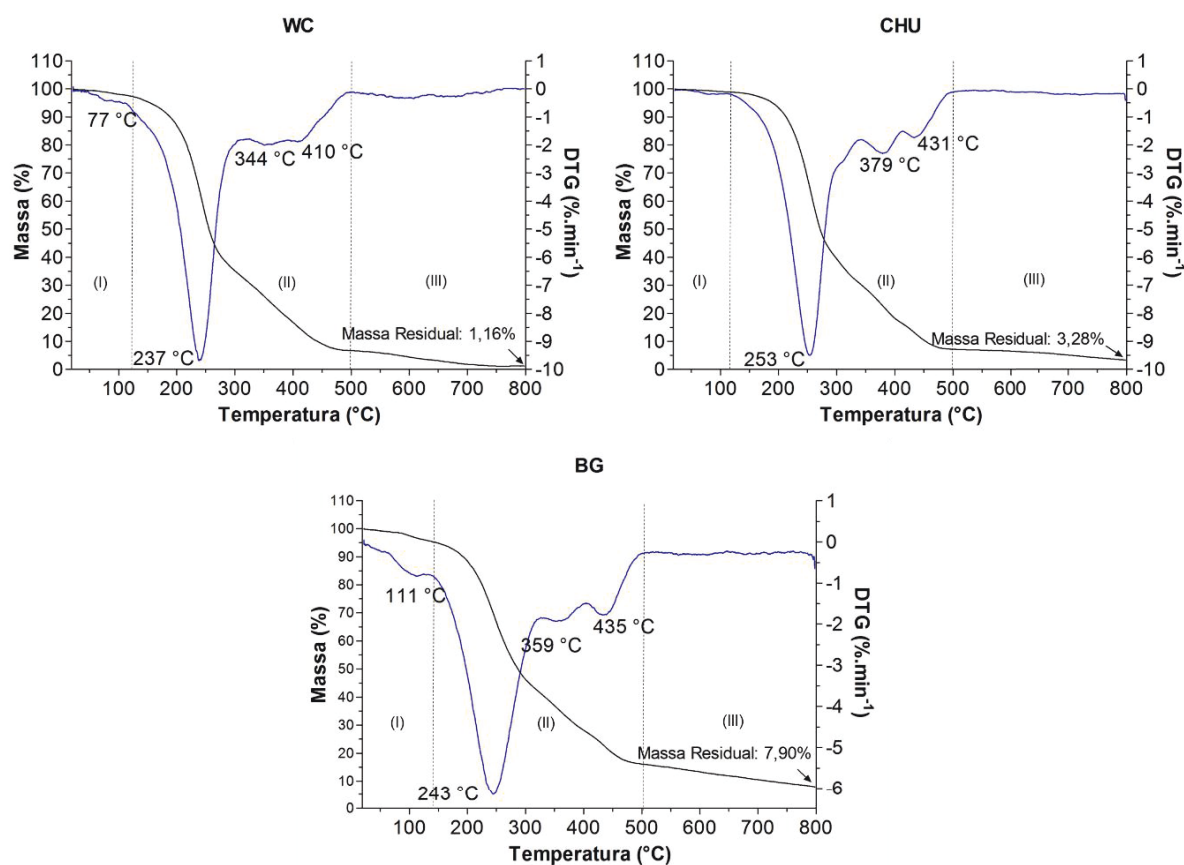
para as microalgas *C. vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* e *Isochrysis galbana*, com temperaturas máximas de degradação entre 283 e 290 °C. Gai et al. (2013) encontrou temperaturas máximas de degradação de 291,85 °C, para *Chlorella pyrenoidosa* quando utilizado uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹.

As biomassas analisadas apresentam carboidratos, proteínas e lipídios em sua composição, no entanto, não é possível observar, nos termogramas obtidos, zonas de pirólise específicas para cada uma dessas moléculas, indicando que a degradação desses polímeros apresenta algum grau de sobreposição entre suas temperaturas de degradação térmica. De acordo com Kassim et al. (2014) e Wang et al. (2007), a segunda etapa pode ser dividida em duas zonas principais com base nas composições da biomassa, onde a primeira zona inclui a decomposição de proteínas e polissacarídeos solúveis, enquanto a segunda zona inclui polissacarídeos insolúveis e lipídios. Essas alterações podem ser atribuídas as diferentes concentrações e composição dos carboidratos e proteínas contidas nas biomassas (BOTHARA; SINGH, 2012; HEMPEL; PETRICK; BEHRENDT, 2012).

A terceira etapa (III) de degradação ocorreu entre aproximadamente 450 °C e a temperatura final de 800 °C. Nessa terceira fase, podemos observar que ainda existe uma perda de massa, referente ao material que não foi degradado ao decorrer do experimento. Os teores de cinzas foram 7,5% (WC), 16,7% (CHU) e 23,6% (BG11). Os teores de cinzas podem variar significativamente na biomassa de microalgas de acordo com a espécie e as condições de cultivo utilizadas (PHUKAN et al., 2011).

A Figura 14 mostra o perfil de degradação térmica dos extratos lipídicos obtidos da biomassa da microalga *D. subspicatus*, cultivada nos meios WC, CHU e BG11. Da mesma forma que para as biomassas microalgais brutas, foi possível observar três eventos distintos. A degradação da primeira etapa (I) ocorreu entre 22 – 93,8 °C, com picos principais em 77 (WC), 80 (CHU) e 111 °C (BG11). A segunda etapa (II) ocorreu entre 126 a 500 °C com perdas de massa de aproximadamente 87,2%, com picos principais em 232 (WC), 253 (CHU) e 243 °C (BG11), atribuídos a degradação da porção glicídica e do glicerol de glicolipídios possivelmente presentes nessa fração. Considerando que existem diferentes tipos de lipídeos presentes nos extratos (ácidos graxos, fosfolipídios, carotenoídes, entre outros), o segundo evento é mais complexo, resultando da somatória de eventos menores, centrados em 344 e 435 °C (KEBELMANN et al., 2013).

FIGURA 14 - TERMOGRAMAS DOS LIPÍDIOS EXTRAÍDOS DA BIOMASSAS MICROALGAIS BRUTAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS (TG —; DTG —)



A partir das análises térmicas dos extratos lipídicos é possível concluir que os termogramas obtidos para as biomassas microalgais brutas são bastante complexos, confirmando que de fato existe sobreposição parcial da degradação dos diferentes tipos de moléculas presentes nas biomassas. Inicialmente é observada a degradação dos carboidratos, parcialmente sobreposta com a degradação das proteínas, que por sua vez apresentam as mesmas características em relação aos lipídeos. Essa sequência de eventos parcialmente sobrepostos gera uma degradação contínua, o que dificulta a correlação entre os resultados analíticos com os das análises termogravimétricas (WANG et al.,2007; KASSIM et al.,2014).

4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

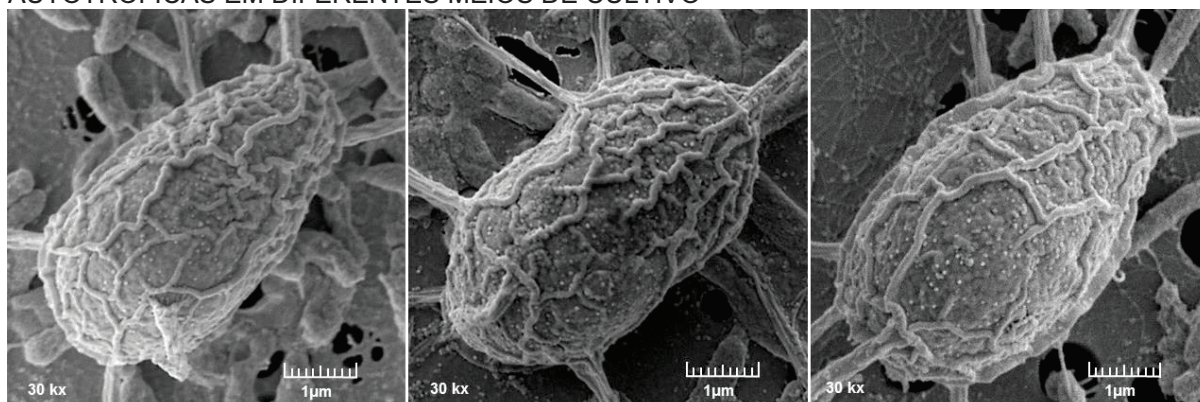
A MEV permite obter informações detalhadas das características microestruturais de diferentes tipos de micro-organismos. A microalga *D. subspicatus*, cultivada autotroficamente em diferentes meios de cultivo (item

3.6.1), foi então analisada por MEV afim de observar diferenças morfológicas superficiais ou de tamanho celular, decorrentes das diferenças do meio de cultivo utilizado.

De modo geral, as microalgas do gênero *Desmodesmus* apresentam um ou vários espinhos, de diferentes tamanhos, em suas células (HEGEWALD, 2000; JOHNSON; FAWLEY; FAWLEY, 2007), e possuem a parede celular altamente ornamentada, com a formação de granulações (HEGEWALD, 1978; AN; FRIEDL; HEGEWALD, 1999). As microalgas *D. subspicatus* possuem cenóbios com uma ou mais célula; seus tamanhos podem variar de 4,8 – 12 μm de comprimento e 2,8 – 7,3 μm de largura; e possuem presença frequente de espinho (SHUBERT; WOZNIK, 2003; HENTSCHKE; TORGAN, 2010; SHUBERT et al., 2014).

Na Figura 15 são apresentadas células da microalga *D. subspicatus*, cultivadas em três diferentes meios de cultivos, WC, CHU e BG11, nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e aeração. De acordo com as imagens analisadas, as células apresentaram características semelhantes entre si, forma elipsoidal, presença de vários espinhos (posicionados mais nas extremidades da célula), e parede celular ornamentada e granulosa com pequenas verrugas distribuídas por toda superfície celular. Quando avaliado o tamanho das células nos três meios em que foram cultivadas, não houve diferença significativa, apresentando um volume médio de 40,1 nm^3 , comprimento médio de $4,88 \pm 0,48 \mu\text{m}$ e largura média de $2,74 \pm 0,34 \mu\text{m}$, considerando o ponto central da célula.

FIGURA 15 - MEV DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA SOB CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

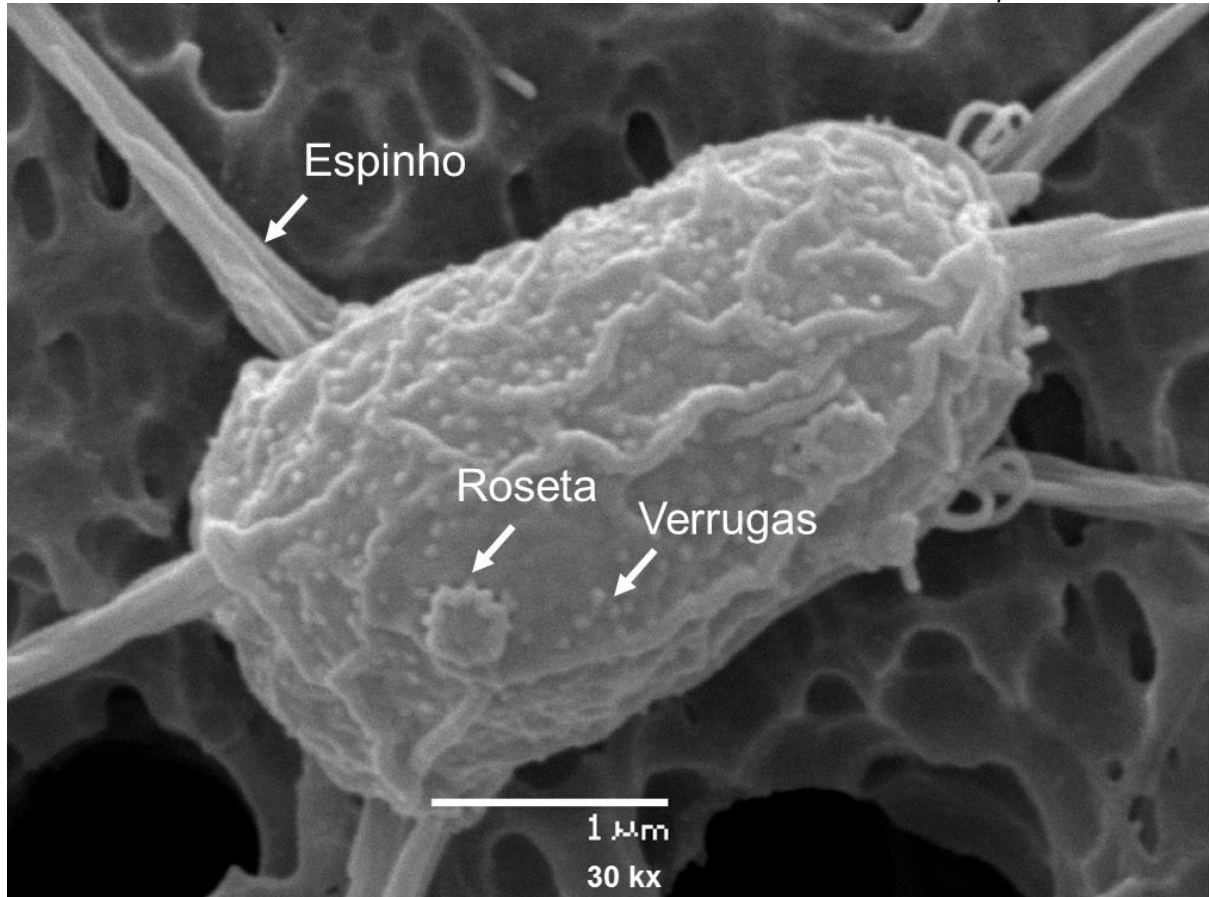


NOTA: A: meio WC; B: meio CHU; C: meio BG11. Cultivos tiveram duração de 12 dias.

Na Figura 16 podem ser observadas de forma mais clara, as características morfológicas identificadas na célula. Na imagem (aumento de 30 mil vezes), é

possível observar os espinhos longos, pequenas verrugas por toda a superfície da célula, e uma roseta, também denominada de abertura (com diâmetro externo médio de 113 nm).

FIGURA 16 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



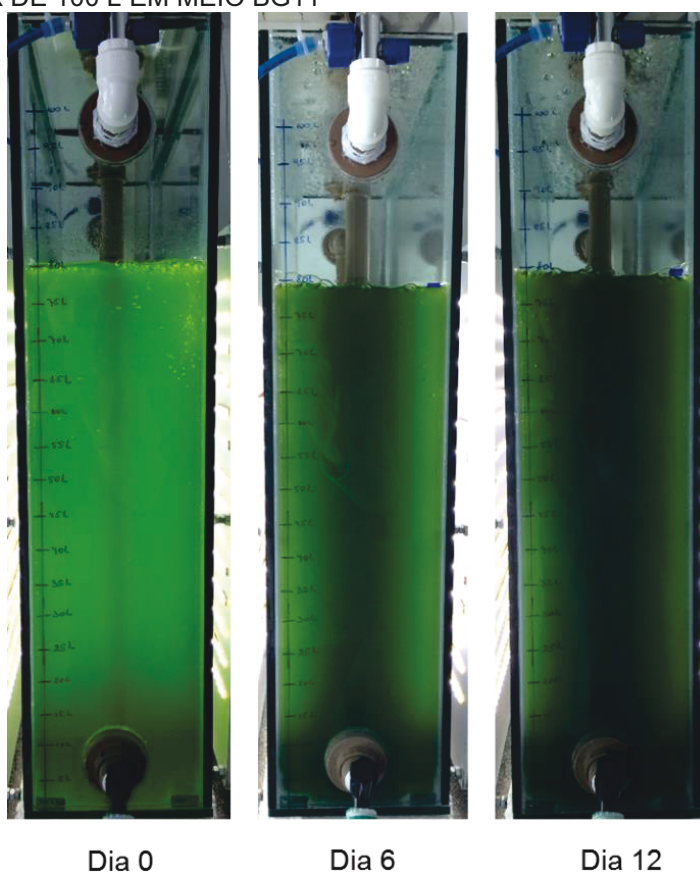
Algumas espécies de microalgas possuem plasticidade fenotípica, que é a capacidade em alterar sua fisiologia ou morfologia em resposta de acordo com o ambiente e/ou condições em que vivem, como por exemplo, intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de nutrientes (SHUBERT; WOZNIAK; LIGEZA, 2014). Alguns estudos evidenciaram alterações morfológicas em *Desmodesmus* relacionadas com a disponibilidade de nutrientes, ocorrendo a formação de colônias em baixas concentrações dos mesmos e formação unicelular em elevadas quantidades de nitrogênio e fósforo (TRAINOR, 1969; SHUBERT; WOZNIAK; LIGEZA, 2014). No entanto, neste estudo, foi possível observar que mesmo os meios de cultura apresentando composições diferentes, os resultados de comparação das imagens de MEV das microalgas, mostraram claramente que as

células de *D. subspicatus* não apresentaram nenhuma diferença morfológica entre si.

4.1.5 Cultivo em Fotobiorreator

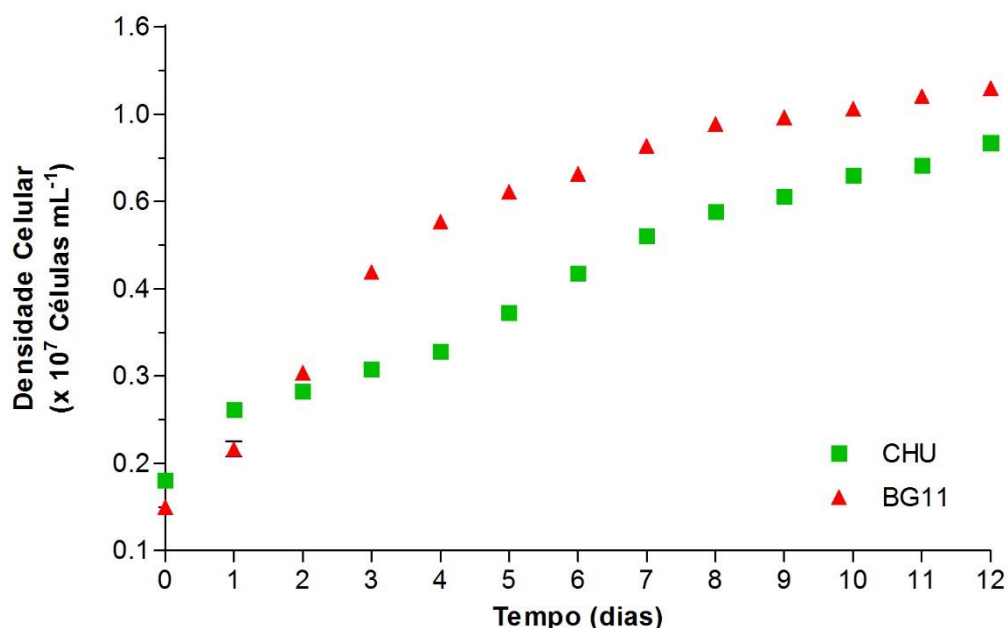
Com o objetivo de escalonar os cultivos, os meios que resultaram numa maior produção de biomassa microalgal foram selecionados e cultivados em um fotobiorreator (FBR) de 100 L. Os cultivos foram realizados com os meios CHU e BG11 e tiveram duração de 12 dias (Figura 17).

FIGURA 17 - CULTIVO AUTOTRÓFICO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM FOTOBIORREATOR DE 100 L EM MEIO BG11



Na Figura 18 encontram-se os perfis cinéticos da microalga *D. subspicatus* cultivada em FBR. Os perfis de crescimento apresentaram-se diferentes em função dos meios de cultivo utilizados. A microalga apresentou fase *lag* de 1 dia para o meio BG11 e de 4 dias para o meio CHU. Após o período de adaptação ambos os cultivos tiveram um crescimento exponencial até o encerramento, não apresentando fase estacionária até o encerramento dos cultivos no 12º dia.

FIGURA 18 - PERFIL CINÉTICO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM FOTOBIOREATOR DE 100 L



NOTA: Resultados foram expresso como média \pm DP ($n = 3$). Cultivos tiveram duração de 12 dias.

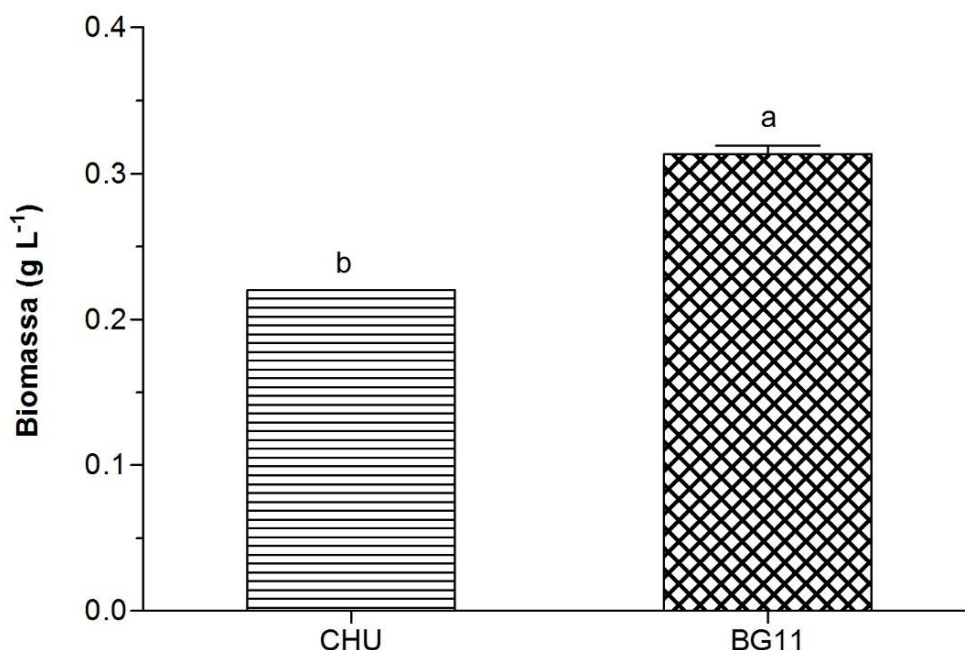
O meio BG11 proporcionou uma densidade celular de $1,15 \times 10^7$ cél mL⁻¹, com taxa de crescimento intrínseca (r) de $0,25 \text{ d}^{-1}$ na fase exponencial e tempo de duplicação (T_2) de 4,1 dias. O meio de cultivo CHU proporcionou uma densidade celular de $0,86 \times 10^7$ cél mL⁻¹, valor 25% menor quando comparada ao meio BG11, com taxa de crescimento intrínseca de $0,14 \text{ d}^{-1}$ e tempo de duplicação de 5,1 dias.

Valores semelhantes referentes aos parâmetros cinéticos foram obtidos por Hakalin (2014), ao cultivar *Scenedesmus* sp. por 7 dias em FBR de placa plana de 1.100 L, atingindo uma densidade celular máxima de $1,12 \times 10^7$ cél mL⁻¹, com taxa de crescimento intrínseca de $0,75 \text{ d}^{-1}$ e tempo de duplicação de 0,96 dia. Gressler et al. (2014) ao cultivar *D. subspicatus* com efluente em fotobiorreator tubular de coluna de 30 L, obtiveram uma densidade celular máxima de $9,11 \times 10^6$ cél mL⁻¹.

Quando comparado aos cultivos realizados em Erlenmeyers (item 4.1.1), foi possível observar que os resultados obtidos em FBR foram inferiores, com uma produção correspondente a 59,6% menor para o meio BG11 ($1,93 \times 10^7$ cél mL⁻¹) e 45,5 % para o meio CHU ($1,89 \times 10^7$ cél mL⁻¹). A taxa de crescimento intrínseca (r) foi de 1,7 vezes menor para o meio BG11 e 3,3 vezes menor para os meio CHU. O tempo de duplicação (T_2) nas células cultivadas em FBR levou em média 2,8 dias a mais.

A produção máxima de biomassa da microalga *D. subspicatus* em FBR (Figura 19) obtida com o meio BG11 foi de $0,31 \text{ g L}^{-1}$, seguida pelo meio CHU, com uma produção de $0,22 \text{ g L}^{-1}$. Esses dados corroboram com os valores de densidade celular apresentados.

FIGURA 19 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA EM FOTOBIOREATOR



NOTA: Resultados foram expresso como média \pm DP ($n = 3$), e comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Cultivos tiveram duração de 12 dias.

Valores semelhantes comparados a produção de biomassa no meio CHU ($0,22 \text{ g L}^{-1}$), foram descritos por Gressler et al. (2014) com a microalga *Desmodesmus subspicatus*, quando cultivada em fotobiorreator tubular com efluente, atingiu $0,23 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa e também por Zhang et al. (2014a), ao cultivar a microalga *Scenedesmus dimorphus* em fotobiorreator com meio de cultivo BG11, onde obteve $0,24 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa. Estudo realizado por Lam e Lee (2014) reportou uma produção de biomassa de $0,32 \text{ g L}^{-1}$, para microalga *Chlorella vulgaris* quando cultivada em FBR de coluna de 100 L, em meio fertilizante. Este resultado assemelha-se ao obtido nesse estudo para o meio BG11 ($0,31 \text{ g L}^{-1}$).

Scenedesmus obtusus, cultivada em diferentes condições, alcançou uma produção de biomassa entre $0,40 - 0,63 \text{ g L}^{-1}$, em FBR *airlift* com volume de 4,1 L (CHANDRA et al., 2017). Feng et al. (2011), obtiveram valores de biomassa que

variaram entre 0,17 – 0,52 g L⁻¹ com a microalga *Chlorella zofingiensis*, quando cultivada em FBR de 60 L em meio BG11.

A produção de biomassa alcançada em FBR para os meios BG11 e CHU foi aproximadamente 55% inferior aos resultados obtidos com os mesmos meios em frascos Erlenmeyer, utilizando uma intensidade luminosa de 111,5 $\mu\text{mol } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

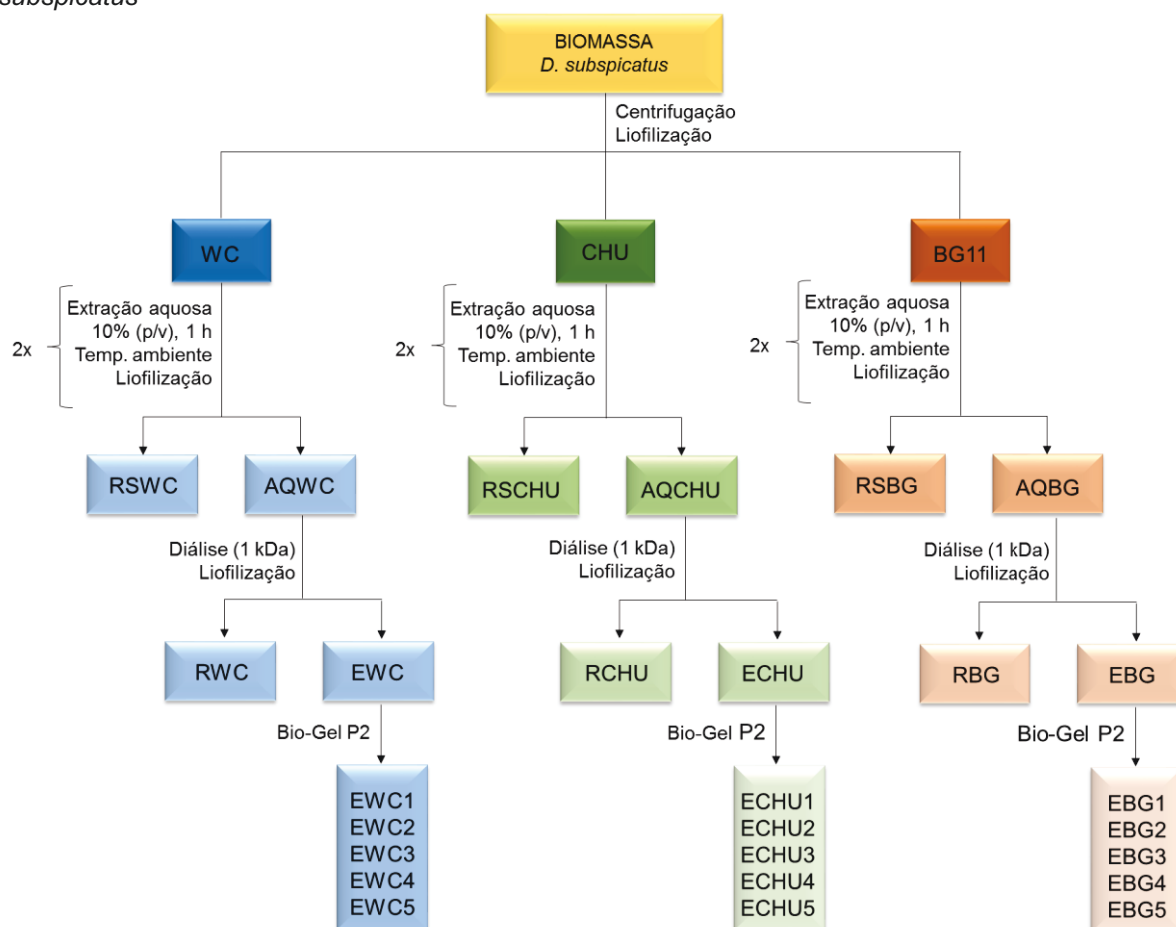
No presente estudo foi utilizado um FBR com intensidade luminosa de 309,2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, cerca de 2,7 vezes mais. Cultivos expostos a alta intensidade luminosa superior ao ponto de saturação podem levar a fotoinibição. De acordo com Vonshak (1997), a fotoinibição é a redução da capacidade fotossintética devido aos danos causados por intensidades luminosas acima da requerida para a realização da fotossíntese de acordo com cada espécie. A intensidade luminosa utilizada o FBR pode, portanto, estar correlacionada com a baixa produção de biomassa em ambos os meios utilizados

4.1.6 Extração de Compostos de Baixa Massa Molecular da Biomassa Microalgal

Após o cultivo das microalgas, nos meios WC, CHU e BG11, e obtenção das respectivas biomassas secas, foram realizadas extrações aquosas seguidas de diálise (em membrana com *cut-off* de 1 kDa) objetivando isolar compostos de baixa massa molecular (Figura 20).

Os rendimentos dos extratos aquosos foram calculados em relação à massa seca inicial da biomassa (% m/m). As frações eluídas (E) obtidas por diálises tiveram seus rendimentos calculados a partir dos extratos aquosos (% m/m) (Tabela 10). Os rendimentos dos extratos aquosos (AQ) em relação a biomassa, variaram pouco entre os diferentes meios, com resultados entre 10,3 – 12,6% m/m. Comportamento similar é observado para os rendimentos das frações E obtidos, com resultados entre 73,0 – 75,0% m/m. Essas frações apresentaram em suas composições maior teor de carboidratos, com variação entre 12,8 – 27,9%. Os teores de proteínas foram menores, variando de 2,2 – 15,5%. Esses dados corroboram com os obtidos por Mazepa (2013), no qual a fração E de *D. subspicatus*, obtida pelo mesmo método, apresentou em sua composição maior teor de carboidratos (22,6%) em relação ao teor de proteínas (19,9%).

FIGURA 20 - FLUXOGRAMA GERAL DE EXTRAÇÃO DA BIOMASSA DE *Desmodemus subspicatus*



NOTA: RS: Biomassa residual da extração aquosa; AQ: Extrato Aquoso; R: Fração retida da diálise em membrana 1 kDa; E: Fração eluída da diálise em membrana 1 kDa.

A fração RS, correspondente ao resíduo da extração aquosa apresentou um rendimento entre 79,6 – 81,8% m/m. Para a fração R o rendimento, obtido foi entre 2,3 – 2,8% m/m.

TABELA 10 - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA BIOMASSA DE *Desmodemus subspicatus*

(continua)

FRAÇÕES	RENDIMENTO (%) ^a	CARBOIDRATOS (%)	PROTEÍNAS (%)
AQWC	12,6	18,1	3,2
AQCHU	10,3	29,7	15,5
AQB	11,0	11,8	11,5
EWC	73,6	25,9	4,8
ECHU	75,0	18,6	2,4
EBG	73,0	12,8	2,2
RSWC	79,6	16,7	5,9
RSCHU	81,8	16,3	14,7

			(conclusão)
RSBG	78,1	11,3	23,2
RWC	2,8	-	-
RCHU	3,2	-	-
RBG	2,3	-	-

NOTA: AQ: extrato aquoso; E: fração eluída da diálise em membrana de 1 kDa; RS: resíduo da extração aquosa; R: fração retida da diálise em membrana de 1 kDa. ^aAQ e RS: Rendimentos em relação a biomassa inicial (% m/m); E e R: Rendimentos em relação ao extrato aquoso (% m/m).

Com o objetivo de facilitar a identificação das moléculas presentes na fração E, as frações EWC, ECHU e EBG, foram submetidas à fracionamento utilizando cromatografia de exclusão em coluna de Bio-Gel P-2, tendo água ultrapura como eluente (Figura 20). A separação foi monitorada por dosagem de carboidratos totais e leitura em espectrofotômetro UV (280 nm) para identificação da presença de proteínas.

Os perfis de eluições obtidos (Figura 21) permitiram identificar 5 subfrações para cada meio de cultivo, denominadas de: EWC1, EWC2, EWC3, EWC4 EWC5, ECHU1, ECHU2, ECHU3, ECHU4, ECHU5, EBG1, EBG2, EBG3, EBG4, EBG5. O percentual de recuperação total médio das frações nesta coluna foi de 73% relativo à massa inicial de fração E aplicada.

O percentual de recuperação para cada fração obtida é demonstrado na Figura 22. As subfrações de maior rendimento foram EWC4, ECHU4 e EBG4 representando 48,3; 28,2 e 36,4% do material recuperado, respectivamente. Os perfis de eluição obtidos nesse trabalho corroboram com os obtidos por Mazepa (2013), que ao fracionar a fração E de *D. subspicatus*, também em Bio-Gel P-2, obteve 6 subtrações, com recuperação total de 70,1% da massa inicial aplicada.

FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO “E” (WC, CHU E BG) POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO EM BIO-GEL P-2

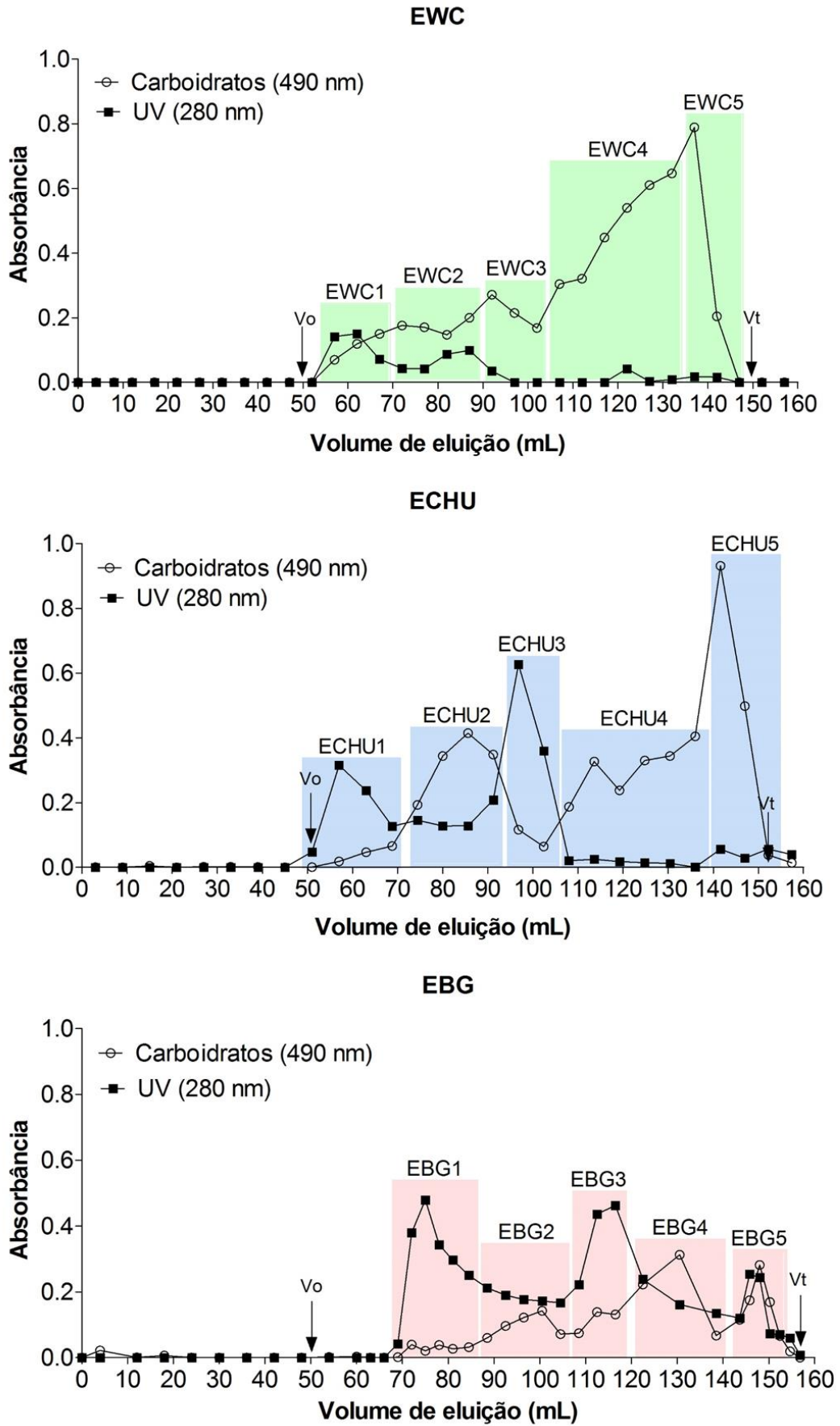
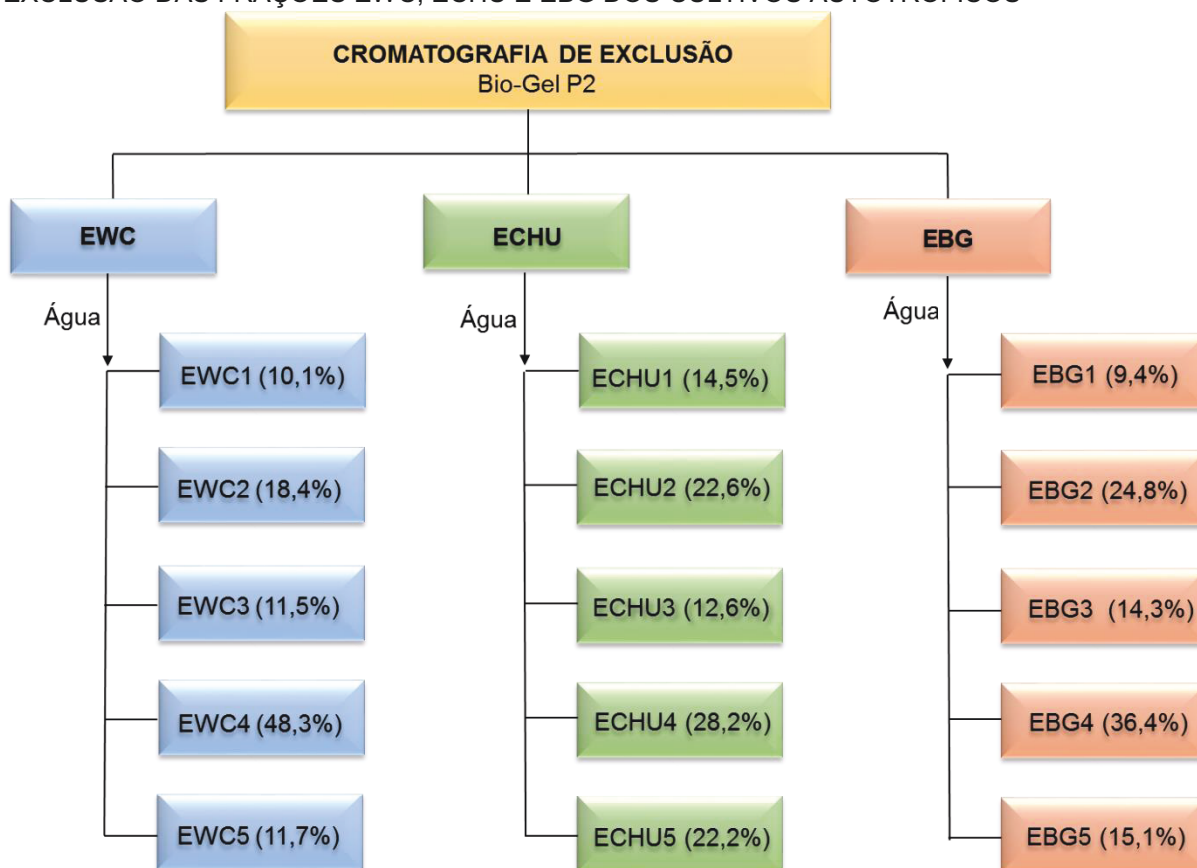


FIGURA 22 – RENDIMENTO DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DAS FRAÇÕES EWC, ECHU E EBG DOS CULTIVOS AUTOTRÓFICOS



NOTA: Percentuais de cada subfração são relativos a massa total recuperada.

Todas as subfrações obtidas foram analisadas por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (UHPLC-MS). As frações EWC, ECHU, e EBG, foram analisadas através de experimentos de RMN monodimensionais (RMN de ^1H e ^{13}C) e as subfrações EWC2, EWC3, EWC4, ECHU2, ECHU4, ECHU5, EBG2, EBG4 e EBG5 através de experimentos de RMN bidimensionais (HSQC).

4.1.7 Identificação e Quantificação de Fitormônios nos Extratos da Microalga *Desmodesmus subspicatus*

As frações E (EWC, ECHU, EBG, EFBR CHU e EFBR BG), correspondentes às frações de baixa massa molar (< 1 kDa) obtidas por diálise, e suas subfrações (EWC 1 – 5; ECHU 1 – 5; EBG 1 – 5), obtidas por cromatografia de exclusão, foram analisadas por UHPLC-MS objetivando identificar e quantificar a presença de fitormônios. Para isso, diferentes padrões de fitormônios foram utilizados, e as

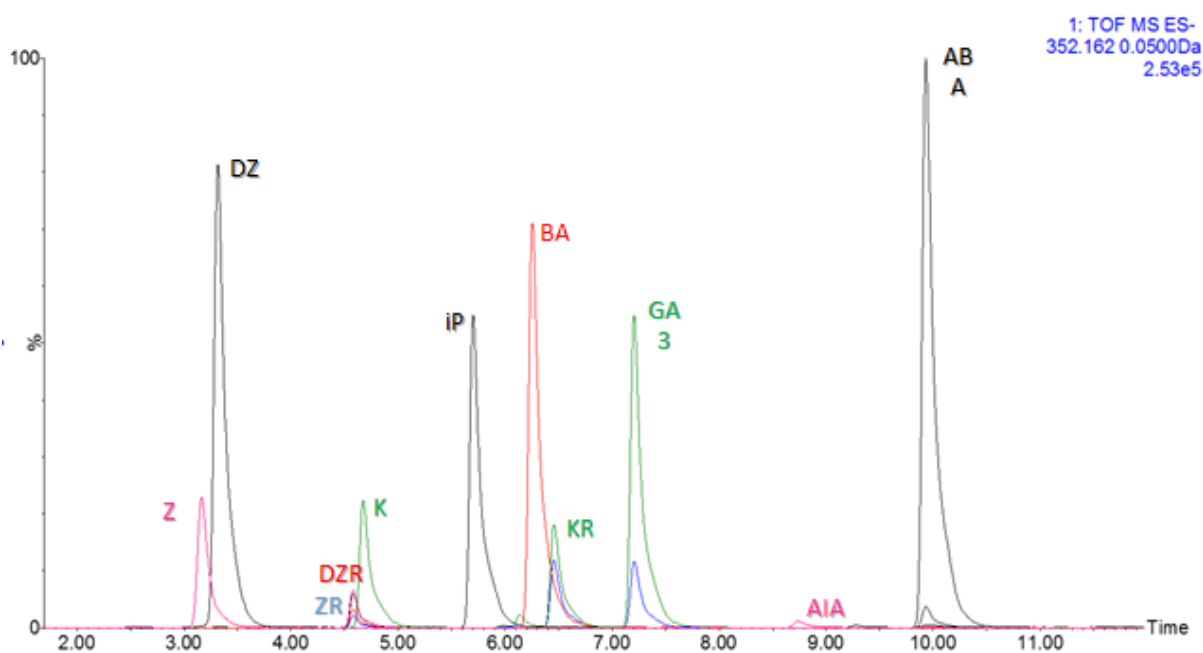
amostras foram comparadas de acordo com seus íons precursores e tempos de retenção (Tabela 11).

TABELA 11 – PADRÕES DE FITORMÔNIOS

PADRÕES DE FITORMÔNIOS	PESO MOLECULAR (g mol ⁻¹)	ÍON PRECURSOR [M+H] ⁺ m/z	TEMPO DE RETENÇÃO (min ⁻¹)
<i>trans</i> -Zeatina (Z) - C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	219,1120	220,1198	3,26
Dihidrozeatina (DZ) C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O	221,1277	222,1355	3,42
Zeatina Ribosídio (ZR) C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₅	351,1543	352,1621	4,61
Dihidrozeatina Ribosídio (DZR) C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₅	353,1699	354,1777	4,62
Cinetina (K) - C ₁₀ H ₉ N ₅ O	215,0807	216,0885	4,67
Isopenteniladenina (iP) C ₁₀ H ₁₃ N ₅	203,1171	204,1249	5,83
Benziladenina (BA) C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225,1014	226,1093	6,36
Cinetina Ribosídio (KR) C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₅	347,1230	348,1308	6,43
Ácido Giberélico (GA3) - C ₁₉ H ₂₂ O ₆	346,1416	347,1495	7,20
Benziladenosina (BAR) C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₄	357,1437	358, 1515	7,98
Ácido Indol Acético (AIA) - C ₁₀ H ₉ NO ₂	175,0633	176, 0712	8,71
Ácido Abscísico (ABA) - C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,1362	265, 1440	9,90

Na Figura 23 é possível observar o cromatograma com o perfil de eluição de cada fitormônio utilizado como padrão para identificação dos mesmo nos extratos aquosos da microalga *D. subspicatus*.

FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE FITORMÔNIOS



Foi possível identificar *trans*-zeatina, um tipo de citocinina, em todas as frações E analisadas (EWC, ECHU, EBG, EFBR CHU e EFBR BG). Nas frações EWC, ECHU e EBG, adicionalmente, foi possível detectar a presença de traços (inferior a 30 pg μL^{-1}) de ácido indol acético (AIA), uma auxina. A estrutura química dos fitormônios detectados (Figura 24), e os cromatogramas juntamente com seus perfis de fragmentação são apresentados na Figura 25.

FIGURA 24 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS FITORMÔNIOS IDENTIFICADOS NAS FRAÇÕES “E”

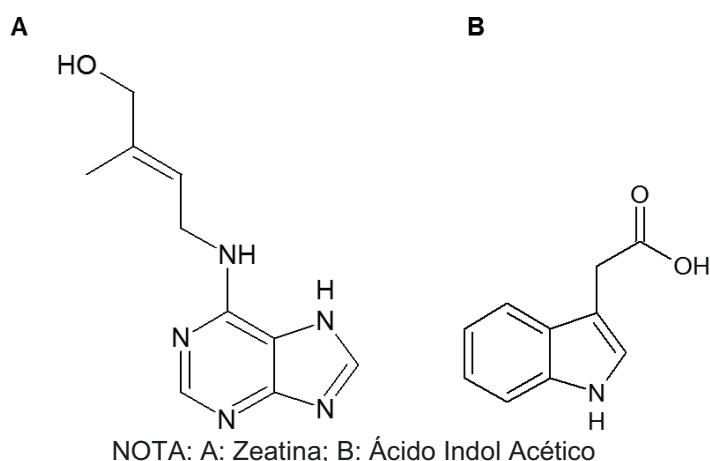
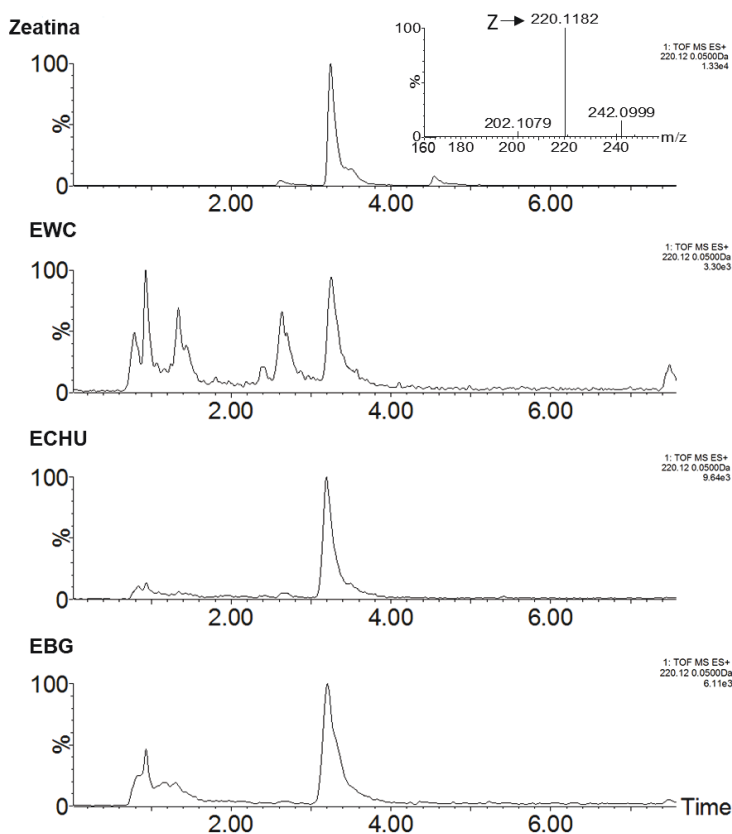
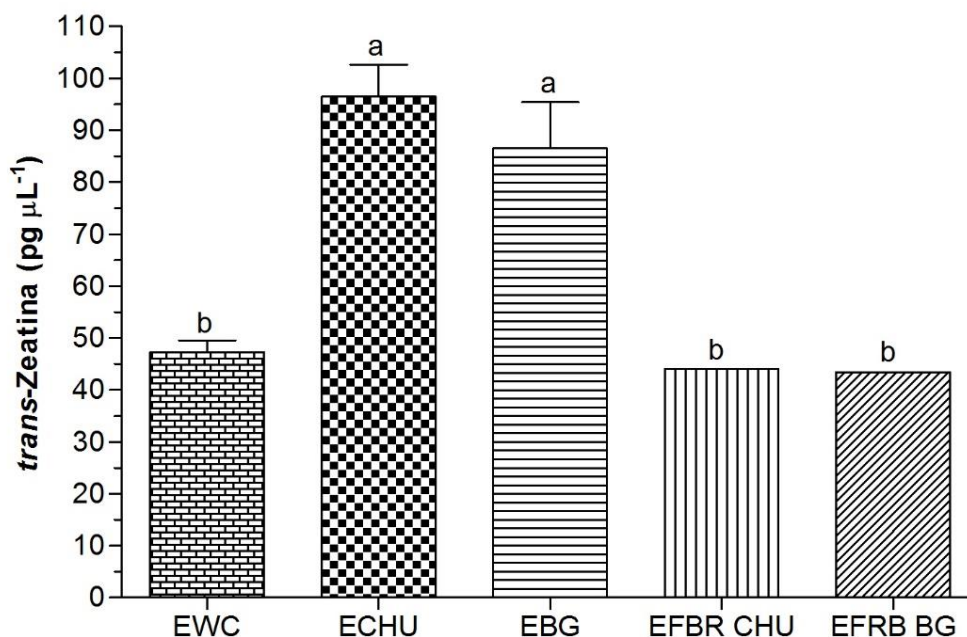


FIGURA 25 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA *trans*-ZEATINA IDENTIFICADA NAS FRAÇÕES EWC, ECHU E EBG



Através da Figura 26, é possível observar que as frações que apresentaram maior concentração de *trans*-zeatina foram ECHU e EBG, não apresentando diferenças significativas entre si e mostrando diferença significativa das frações EWC, EFBR CHU e EFBR BG.

FIGURA 26 – QUANTIFICAÇÃO DE *trans*-ZEATINA PRESENTE NAS FRAÇÕES “E” OBTIDAS DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM CONDIÇÕES AUTOTRÓFICAS



NOTA: Resultados foram expresso como média \pm DP ($n = 2$), e comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Observa-se a presença de *trans*-zeatina, um tipo de citocinina, em todas as frações E, com teores variando entre 43,4 – 96,4 pg μL^{-1} . A fração ECHU apresentou a maior concentração de *trans*-zeatina, 96,4 pg μL^{-1} , sendo esta 10,2 e 50,9% mais concentrada que as frações EBG e EWC, onde obteve-se 86,5 e 43,4 pg μL^{-1} de *trans*-zeatina, respectivamente. Nas frações EWC, ECHU e EBG, também foi possível observar a presença do fitormônio AIA, porém, devido a sua baixa concentração (< 30 pg μL^{-1}), não foi possível realizar sua quantificação.

Para as frações EFBR CHU e EFBR BG, os teores encontrados foram semelhantes entre si, 44,0 e 43,4 pg μL^{-1} de *trans*-zeatina, respectivamente. Observa-se que as concentrações de *trans*-zeatina obtida em frações derivadas de cultivos em FBR com meios CHU e BG11 foram aproximadamente 50% inferiores às obtidas nos mesmos meios de cultivo em Erlenmeyer. Dessa forma, podemos

afirmar que as condições de cultivos influenciaram de forma direta na produção desse fitormônio.

Todas as subfrações obtidas após o fracionamento em cromatografia de exclusão, foram comparadas quanto a sua composição de fitormônios. Podemos observar que todas as subfrações de número 2 (EWC2, ECHU2 e EBG2) foram as que apresentam maior concentração de *trans*-zeatina, entre 53,3 – 113,0 pg μL^{-1} . Observa-se que nem todas as subfrações, obtidas por meio de fracionamento da fração E via cromatografia de exclusão, apresentaram fitormônios em sua composição. Para o EWC, apenas as subfrações EWC1 e EWC2 apresentaram *trans*-zeatina, com teores de 44,3 e 53,3 pg μL^{-1} , respectivamente. Para ECHU, identificou-se *trans*-zeatina nas subfrações ECHU1, ECHU2 e ECHU3, com teores de 58,0; 99,7 e 34,8 pg μL^{-1} , respectivamente. Para EBG, todas as subfrações obtidas apresentaram *trans*-zeatina em sua composição, com teores que variaram entre 32,9 – 113,0 pg μL^{-1} . Algumas subfrações, EWC2, EWC3, ECHU3 e EBG5, apresentaram também em sua composição traços de AIA (< 30 pg μL^{-1}), assim como suas frações de origem. Com base nesses resultados, é possível observar que a cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 foi eficiente na separação de subfrações enriquecidas por moléculas de baixa massa molar (< 1 kDa). A Tabela 12 reúne os fitormônios identificados e quantificados em cada uma das frações e subfrações analisadas.

A capacidade das microalgas em produzirem compostos como fitormônios tem sido relatada em diversos estudos. Diferentes citocininas, entre elas a zeatina, foram identificadas em *Scenedesmus sp.*, *Chlorella sp.*, *Chlorella minutissima*, *Protococcus viridis* (ÖRDÖG et al., 2004; STIRK et al., 2011). Outras classes de fitormônios, como auxinas, giberilinas e brassinosteróides foram encontrados em 24 espécies diferentes de microalgas, entre elas *Desmodesmus armatus*, *C. vulgaris*, *Acutodesmus acuminatus* (STIRK et al., 2013a; b).

A partir dos resultados obtidos para produção de biomassa em condições autotróficas, em frascos Erlenmeyer e FBR, e da quantificação de *trans*-zeatina nos meios WC, CHU, BG11, calculou-se a produção de *trans*-zeatina por grama de biomassa seca de *D. subspicatus*. Os resultados são apresentados na Figura 27.

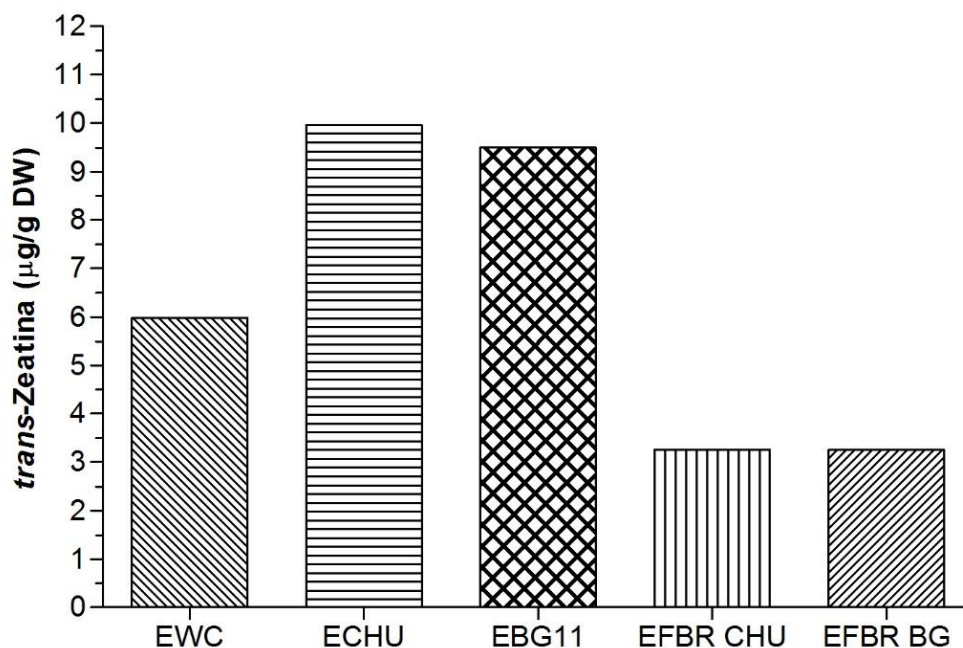
TABELA 12 - FITORMÔNIOS IDENTIFICADOS E QUANTIFICADOS NAS FRAÇÕES “E” OBTIDAS DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

AMOSTRA	<i>trans</i> -ZEATINA (pg μL^{-1})	AIA (pg μL^{-1})
FRAÇÕES E		
EWC	47,3	Tr
ECHU	96,4	Tr
EBG	86,5	Tr
EFBR CHU	44,0	-
EFBR BG	43,4	-
SUBFRAÇÕES		
EWC 1	44,3	-
EWC 2	53,3	Tr
EWC 3	-	Tr
EWC 4	-	-
EWC 5	-	-
ECHU 1	58,0	-
ECHU 2	99,7	-
ECHU 3	34,8	Tr
ECHU 4	-	-
ECHU 5	-	-
EBG 1	71,4	-
EBG 2	113,0	-
EBG 3	41,9	-
EBG 4	32,9	-
EBG 5	39,2	Tr

NOTA: Tr: traços (inferior a 30 pg μL^{-1}).

Não é possível observar uma relação direta entre a produção de biomassa microalgal e *trans*-zeatina. O meio BG, onde obteve-se maior rendimento de biomassa (0,65 g L⁻¹), não resultou na maior concentração de *trans*-zeatina, atingindo uma produção de 9,50 μg de *trans*-zeatina/g DW (0,043 $\mu\text{mol/g}$ DW). A fração ECHU, onde obteve-se a segunda maior biomassa microalgal (0,56 g L⁻¹), resultou na maior produção de *trans*-zeatina, com 9,97 μg de *trans*-zeatina/g DW (0,045 $\mu\text{mol/g}$ DW). A fração EWC foi a que obteve menor produção de *trans*-zeatina em relação a biomassa, com apenas 5,98 $\mu\text{g/g}$ DW (0,027 $\mu\text{mol/g}$ DW). As frações ECHU FBR e EBG FBR obtiveram produção bastante inferior aos cultivos em Erlenmeyer, ambos com valores de 3,26 $\mu\text{g/g}$ DW (0,015 $\mu\text{mol/g}$ DW).

FIGURA 27 – ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE *trans* - ZEATINA NA BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO



Stirk et al. (2013a) identificaram e quantificaram fitormônios em 24 espécies de microalgas, sendo observado, para algumas espécies, maiores concentrações de AIA quando obteve-se maior acúmulo de biomassa. Os valores de AIA variaram de 0,50 – 71,49 nmol/g DW. Adicionalmente nesse mesmo estudo, também foi possível identificar 19 tipos de citocininas, entre elas a *trans*-zeatina, com valores de 8,8 – 92,4 pmol/g DW.

Ördög et al. (2004) ao quantificarem a zeatina identificada nas microalgas *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Chlorella minutissima*, e *Protococcus viridis* reportaram valores de 0,11 – 0,95 pmol/g DW. Jirásková et al. (2009), quantificaram fitormônios em diversos gêneros da microalga *Chlorella*, utilizando diferentes métodos para quantificar, entre eles HPLC-MS, no qual foi reportado valores de 2,1 – 5,6 pmol/g de *trans*-zeatina na biomassa úmida, e valores entre 0,19 – 14,31 nmol/g de AIA na biomassa seca.

Amostras dos meios de cultura após o crescimento da microalga foram cromatografadas em Bio-Gel P-2, e analisadas, igualmente aos extratos aquosos, em UPLC-MS objetivando verificar a presença de fitormônios e confirmar que os fitormônios identificados para os extratos aquosos da microalga *D. subspicatus* são de fato de origem intracelular. Não foi possível identificar nenhum fitormônio nessas

subfrações do meio de cultura, confirmando a hipótese que a microalga em estudo não elimina os fitormônios no meio de cultura durante o crescimento celular.

Os resultados apresentados nesse estudo tanto para identificação quanto para quantificação dos fitormônios presentes na microalga *D. subspicatus*, quando comparados com das literaturas, são bastante superiores. Cabe ainda ressaltar que não foi utilizando solvente orgânico para o processo de extração, todas as amostras foram provenientes de extração aquosa.

4.1.8 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das Frações “E” e Subfrações dos cultivos autotróficos

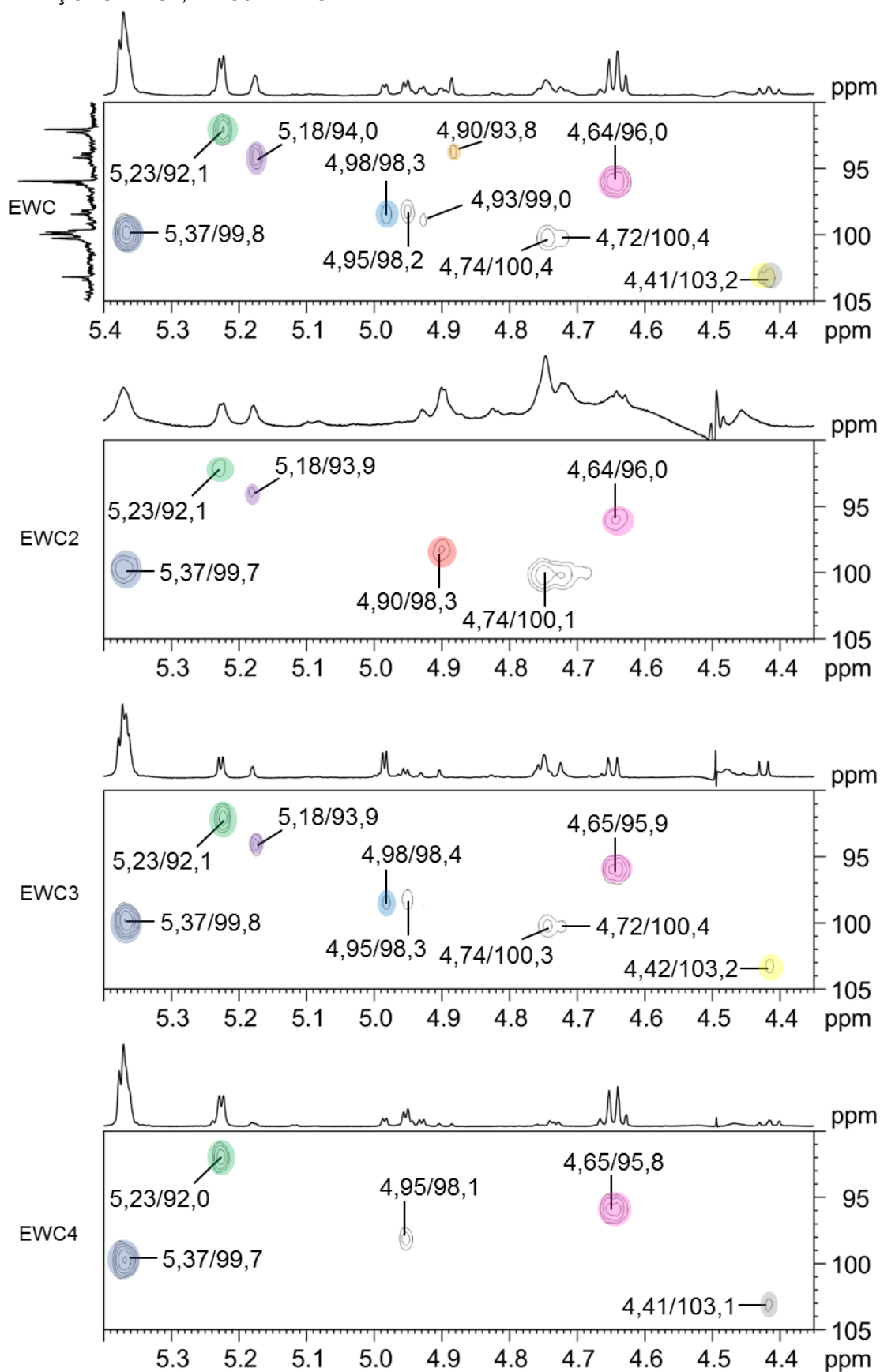
As frações de baixa massa molecular (< 1 kDa) EWC, ECHU e EBG e suas subfrações, obtidas por cromatografia de exclusão, foram analisadas por RMN, e comparadas aos assinalamentos descritos na literatura e aos encontrados por Mazepa (2013) para a fração E da microalga *D. subspicatus* quando esta foi cultivada em Guillard f/2 modificado.

A região anomérica dos espectros de HSQC da fração EWC e suas subfrações EWC2, EWC3 e EWC4 são apresentados na Figura 28. Como esperado, é possível observar que os sinais existentes nas subfrações estão também presentes em sua fração de origem EWC.

Na fração EWC2 é possível visualizar uma correlação em 4,89/98,3 ppm, correspondente ao H1/C1 de unidades de α -D-Sulfoquinovose-(1 \rightarrow), indicando a presença de moléculas de Sulfoquinovosil-glicerol (KURIHARA et al., 1997; ROY; HEWLINS, 1998). A correlação intensa, observada em 5,37/99,7 ppm, juntamente com as correlações encontradas na região do anel (H2/C2: 3,59/71,7; H3/C3: 3,96/73,2; H4/C4: 3,64/77,4 ppm), indicam a presença de unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4)-ligadas (RIZZI, 2010; GOO et al., 2013). A correlação em 99,8/5,33 ppm é correspondente aos terminais não redutores de unidades D-Glcp (CHENG; NEISS, 2012; JORDAN et al., 2014; KUZ'MINA et al., 2015). Observa-se, adicionalmente nessa fração as correlações em 5,23/92,1 e 4,64/96,0 ppm, atribuídas a estruturas redutoras de α -D-Glcp e β -D-Glcp (BOCK; PEDERSEN, 1983). A presença dessas unidades monossacarídicas em suas configurações α e β foram confirmadas por meio das constantes de acoplamento (J), entre H-1 e H-2 ($J_{1,2}$ em Hz), determinadas através do espectro ^1H sendo $J_{1,2} = 3,8$ Hz e $J_{1,2} = 7,9$ Hz, respectivamente.

Segundo Bubb (2003), constantes de acoplamento ($J_{1,2}$) entre 7 – 9 Hz indicam acoplamento diaxial associado às configurações β e valores entre 2 – 4 Hz são indicativos de acoplamento equatorial-axial de anômeros α . A presença de sinais característicos de unidades redutoras (α/β -D-Glcp), unidades não redutoras (α -D-Glcp-(1 \rightarrow), juntamente com os sinais atribuídos às unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4)-ligadas, sugerem a presença de malto-oligossacarídeos ([α -D-Glucopiranosose-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glucopiranosose] $_n$) nessa fração (HEYRAUD et al., 1979). Nessa mesma fração, observa-se a correlação em 5,18/94,0 ppm, com $J_{1,2}$ de 1,5 Hz, atribuída a unidades redutoras de α -D-Manp. Valores de $J_{1,2}$ próximos a 1,6 Hz são indicativos típicos de acoplamento diequatorial, como é o caso da α -D-Manose, que tem o H-2 em posição equatorial (BUBB, 2003).

FIGURA 28 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO EWC E SUBFRAÇÕES EWC2, EWC3 E EWC4



NOTA: Solvente: D₂O; temperatura: 50 °C; padrão interno: acetona (2,224/30,2 ppm).

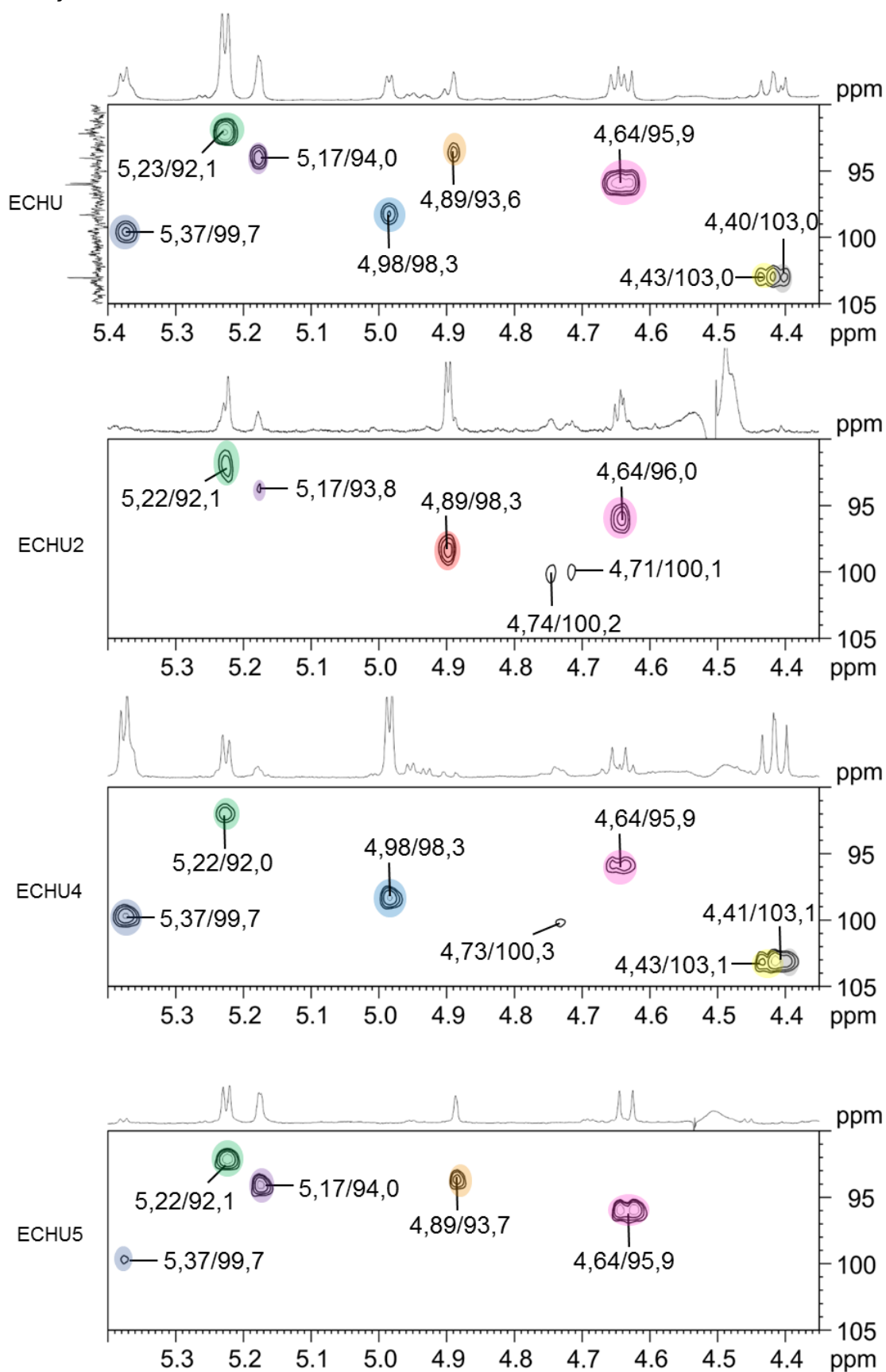
Na fração EWC3, adicionalmente as correlações monossacarídicas e oligossacarídicas descritas na subfração anterior, é possível observar correlações intensas em 4,42/103 e 4,98/98,4 ppm referentes ao H1/C1 de unidades de 6- β -D-Galp-(1 \rightarrow e α -D-Galp-(1 \rightarrow pertencentes ao glicosídeo Digalactosil-glicerol (α -D-Galactopiranosose-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galactopiranosose-(1 \rightarrow 1)-Glicerol) (SASSAKI et al., 1999; ARNOLD et al., 2015).

Na fração EWC4, é possível observar uma correlação em 4,41/103,1 ppm atribuída a unidades de β -D-Galp-(1 \rightarrow , constituintes do glicosídeo Monogalactosil-glicerol (β -D-Galactopiranosose-(1 \rightarrow 1)-Glicerol) (SASSAKI et al., 1999; RUBERTO; TRINGALI, 2004). As correlações em 5,37/99,7; 5,23/92,0 e 4,65/95,8 ppm, descritas anteriormente para as frações EWC2, foram correlacionadas à unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4)-ligadas, terminais redutores α -D-Glcp e β -D-Glcp, respectivamente, sugerindo também a presença de malto-oligossacarídeos (HEYRAUD et al., 1979; BOCK; PEDERSEN, 1983; SASSAKI et al., 1999; RIZZI, 2010; GOO et al., 2013). Complementarmente, observa-se na fração EBG uma correlação em 4,89/93,8 ppm ($J_{1,2}$ = 0,7 Hz) correlacionada ao monossacarídeo α -D-Manp, em função de seus valores típicos de acoplamento axial-equatorial (BUBB, 2003).

A região anomérica dos espectros de HSQC da fração ECHU e suas subfrações ECHU2, ECHU4 e ECHU5 são apresentados na Figura 29. É possível observar que, semelhantemente aos resultados obtidos para a fração EWC, todos os sinais observados na região de carbonos anoméricos do espectro de HSQC da fração ECHU estão presentes em suas subfrações.

Na fração ECHU2 é possível visualizar uma correlação em 4,89/98,3 ppm, correspondente ao H1/C1 de unidades de α -D-Sulfoquinovose-(1 \rightarrow , indicando a presença de moléculas de Sulfoquinovosil-glicerol, assim como na fração EWC2 discutida anteriormente (KURIHARA et al., 1997; ROY; HEWLINS, 1998). Visualiza-se também correlações em 5,22/92,1 ($J_{1,2}$ = 3,8 Hz); 5,17/93,8 ppm ($J_{1,2}$ = 1,5 Hz) e 4,63/96,0 ppm ($J_{1,2}$ = 7,9 Hz), atribuídas aos monossacarídeos α -D-Glcp, α -D-Manp e β -D-Glcp (BOCK; PEDERSEN, 1983).

FIGURA 29 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO ECHU E SUBFRAÇÕES ECHU2, ECHU4 E ECHU5



NOTA: Solvente: D₂O; temperatura: 50 °C; padrão interno: acetona (2,224/30,2 ppm).

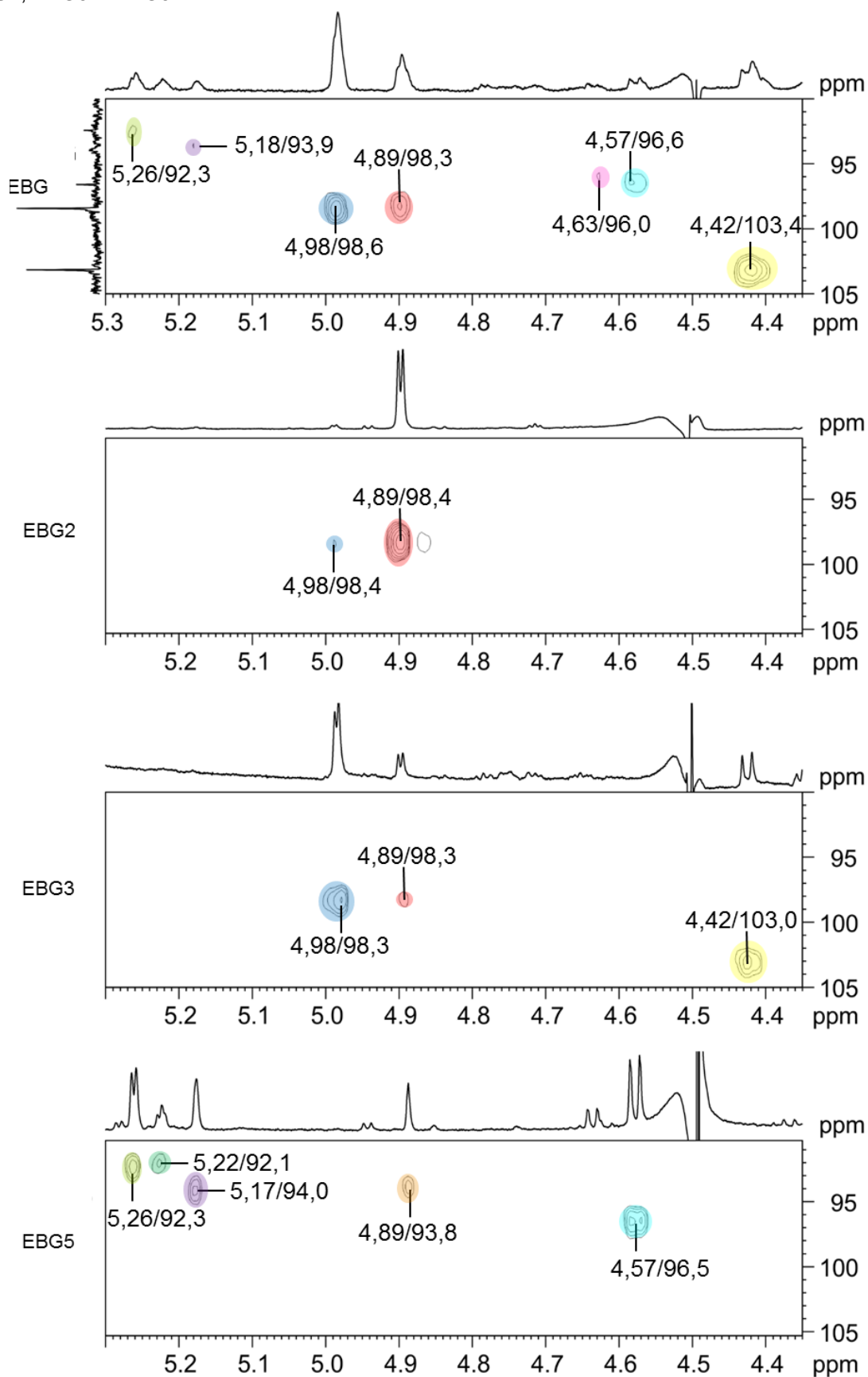
Na fração ECHU4 é possível observar correlações intensas em 4,43/103,1; 4,98/98,3 e 4,41/103,1 ppm referentes ao H1/C1 de unidades de 6- β -D-Galp-(1 \rightarrow , α -D-Galp-(1 \rightarrow e β -D-Galp-(1 \rightarrow , indicando a presença dos glicosídeos Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol (SASSAKI et al., 1999; RUBERTO; TRINGALI, 2004; ARNOLD et al., 2015). Adicionalmente, visualiza-se correlações de unidades redutoras de D-Glcp (5,22/92,0 e 4,64/95,9 ppm) e unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4)-ligadas (5,37/99,7 ppm), descritas anteriormente para as frações EWC2, indicando a presença de malto-oligossacarídeos (HEYRAUD et al., 1979; BOCK; PEDERSEN, 1983; SASSAKI et al., 1999; RIZZI, 2010; GOO et al., 2013).

Observa-se na fração ECHU5 correlações em 5,37/99,7; 5,22/92,1; 5,17/94,0 e 4,64/95,9 ppm, descritas anteriormente para as frações ECHU2 e ECHU4 e atribuídas, respectivamente, a unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4)-ligadas e a unidades redutoras de α -D-Glcp, α -D-Manp e β -D-Glcp (HEYRAUD et al., 1979; BOCK; PEDERSEN, 1983; BUBB, 2003). Adicionalmente, observa-se uma correlação em 4,89/93,7 ppm, com $J_{1,2} = 0,7$ Hz, atribuída a β -D-Manp (BUBB, 2003).

A região anomérica dos espectros de HSQC da fração EBG e suas subfrações EBG2, EBG3 e EBG5 são apresentados na Figura 30. É possível observar que os sinais visualizados na região de carbonos anoméricos do espectro de HSQC da fração EBG estão presentes em suas subfrações. Em comparação aos espectros obtidos para as frações EWC e ECHU, os espectros da fração EBG e subfrações são mais simples, apresentando menos correlações.

Assim como nas frações EWC2 e ECHU2, na fração EBG2 é possível visualizar uma correlação principal em 4,89/98,4 ppm, correspondente ao H1/C1 de unidades de α -D-Sulfoquinovose-(1 \rightarrow (KURIHARA et al., 1997; ROY; HEWLINS, 1998). Visualiza-se também uma correlação de baixa intensidade em 4,98/98,5 ppm, correspondente ao H1/C1 de unidades de α -D-Galp-(1 \rightarrow , o que sugere a presença de galactosídeos (SASSAKI et al., 1999). Na fração EBG3, adicionalmente as correlações encontradas na subfração anterior, é possível observar uma correlação intensa em 4,42/103,0 ppm referentes ao H1/C1 de unidades de 6- β -D-Galp-(1 \rightarrow , indicando que os galactosídeos presentes em EBG são moléculas de Digalactosil-glicerol (SASSAKI et al., 1999; ARNOLD et al., 2015).

FIGURA 30 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO EBG E SUBFRAÇÕES EBG2, EBG3 E EBG5

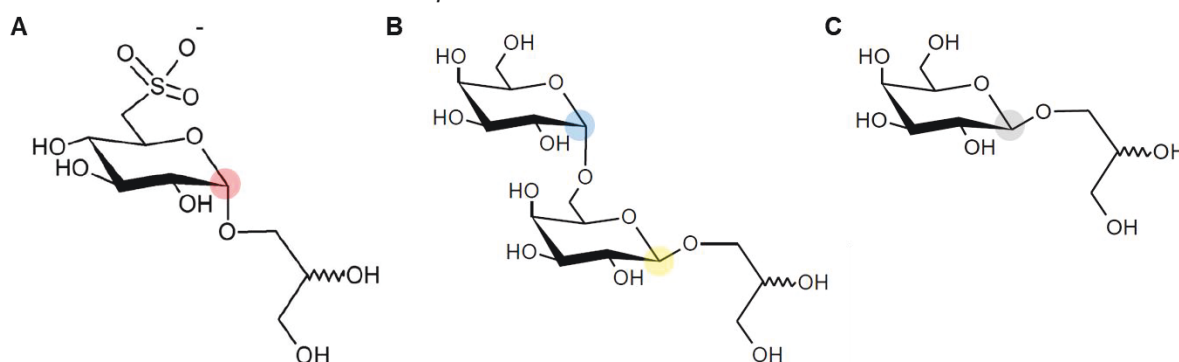


NOTA: Solvente: D_2O ; temperatura: 50 $^\circ\text{C}$; padrão interno: acetona (2,224/30,2 ppm).

Na região anomérica de EBG5 é possível visualizar correlações em 5,26/92,3 ($J_{1,2} = 3,6$ Hz); 5,22/92,1 ($J_{1,2} = 3,8$ Hz) e 5,17/94,0 ppm ($J_{1,2} = 1,5$ Hz), correlacionadas aos monossacarídeos α -D-Galp, α -D-Glcp e α -D-Manp, respectivamente. Em campo mais alto observa-se correlações em 4,89/93,8 ($J_{1,2} = 0,7$ Hz) e 4,57/96,5 ppm ($J_{1,2} = 8,0$ Hz), características de β -D-Manp e β -D-Galp (BOCK; PEDERSEN, 1983; BUBB, 2003; TAFAZZOLI; GHIASI, 2007). Adicionalmente, é possível observar na fração EBG a correlação em 4,63/96,0 ppm ($J_{1,2} = 7,9$ Hz) atribuída ao monossacarídeo β -D-Glcp (BOCK; PEDERSEN, 1983; TAFAZZOLI; GHIASI, 2007).

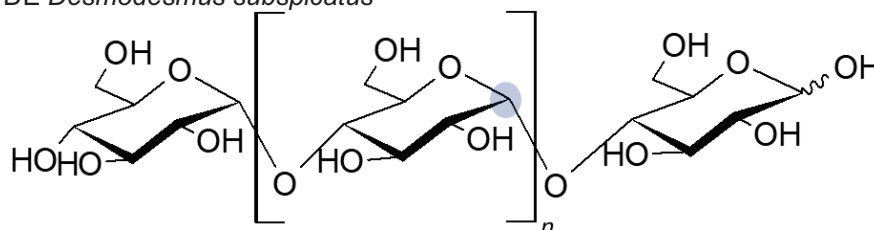
Em resumo, foi possível identificar a presença de glicosídeos (Sulfoquinovosil-glicerol, Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol) (Figura 31), malto-oligossacarídeos (α -(1 \rightarrow 4)-Glucoligossacarídeos) (Figura 32) e diferentes monossacarídeos em configurações α e β (D-Glcp, D-Manp e D-Galp) (Figura 33). Todos os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos observados na região anomérica das frações e subfrações derivadas são apresentados na Tabela 13.

FIGURA 31 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS GLICOSÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DERIVADAS DE *Desmodemus subspicatus*



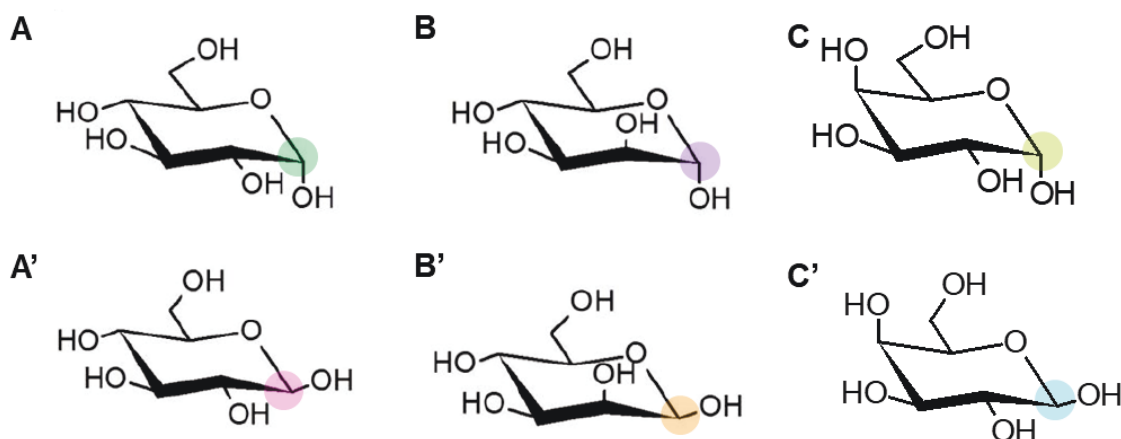
NOTA: A: Sulfoquinovosil-glicerol (6-Sulfoquinovopirranose-(1 \rightarrow 1)-Glicerol);
 B: Digalactosil-glicerol (α -D-Galactopirranose-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galactopirranose-(1 \rightarrow 1)-Glicerol);
 C: Monogalactosil-glicerol (β -D-Galactopirranose-(1 \rightarrow 1)-Glicerol).

FIGURA 32 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS OLIGOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DERIVADAS DE *Desmodemus subspicatus*



NOTA: Malto-oligossacarídeos ([α -D-Glucopirranose-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glucopirranose] $_n$)

FIGURA 33 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DERIVADAS DE *Desmodesmus subspicatus*



NOTA: A: α -D-Glucopirranose; A': β -D-Glucopirranose; B: α -D-Manopirranose; B': β -D-Manopirranose; C: α -D-Galactopirranose; C': β -D-Galactopirranose.

De modo geral, foi possível observar pequenas diferenças entre os espectros de RMN das frações E provenientes da microalga *D. subspicatus* quando cultivada autotrophicamente em diferentes meios de cultivo. Em comparação as frações derivadas do meio WC e CHU, as frações EBG apresentaram sinais referentes a monossacarídeos D-Galp, não visualizados para as demais frações. As frações EWC e ECHU apresentaram sinais característicos de oligossacarídeos, sinais estes inexistentes nas frações EBG.

Mazepa (2013) analisou por RMN frações E da microalga *D. subspicatus* cultivada em meio Guillard f/2 modificado. Os resultados permitiram a identificação dos glicosídeos Sulfoquinovosil-glicerol, Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol, e dos monossacarídeos D-Glucose e D-Manose, estruturas estas também observadas no presente estudo. Cabe ressaltar que os espectros de RMN das frações derivadas dos meios WC e CHU se mostraram mais complexos que os obtidos por Mazepa (2013), indicando adicionalmente a presença de outras moléculas, como oligossacarídeos. Fernandes et al. (2017) analisaram a influência da variação na composição do meio de cultivo sobre as biomassas de *Nannochloropsis gaditana*, *Rhodomonas marina* e *Isochrysis* sp. Os resultados obtidos sugeriram que alterações nos teores do macro e micronutrientes resultaram em alterações na composição monossacarídica dessas biomassas. Com base nos resultados obtidos e na literatura disponível, é, portanto, possível sugerir que o meio de cultivo influencia diretamente na produção de compostos pela microalga.

TABELA 13 - ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO PRESENTES NAS FRAÇÕES “E” SUBFRAÇÕES

UNIDADES	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) H1/C1											
	EW C	EW C2	EW C3	EW C4	ECHU	ECHU2	ECHU4	ECHU5	EBG	EBG2	EBG3	EBG5
Sulfoquinovosil-glicerol												
α-D-Sulfoquinovose-(1→	-	4,90/ 98,3	-	-	-	4,89/ 98,3	-	-	4,89/ 98,3	4,89/ 98,4	4,89/ 98,3	-
Digalactosil-glicerol												
6-β-D-Galactopiranosse-(1→	4,41/ 103,2	-	4,42/ 103,2	-	4,43/ 103,0	-	4,43/ 103,1	-	4,42/ 103,4	-	4,42/ 103,0	-
α-D-Galactopiranosse-(1→	4,98/ 98,3	-	4,98/ 98,4	-	4,98/ 98,3	-	4,98/ 98,3	-	4,98/ 98,6	4,98/ 98,5	4,98/ 98,3	-
Monogalactosil-glicerol												
β-D-Galactopiranosse-(1→	103,2	-	-	4,41/ 103,1	4,40/ 103,0	-	4,41/ 103,1	-	-	-	-	-
Malto-oligossacarídeos												
4→)-α-D-Glucopiranosse	5,23/ 92,1	5,23/ 92,1	5,23/ 92,1	5,23/ 92,0	5,23/ 92,1	-	5,22/ 92,0	5,22/ 92,1	-	-	-	-
4→)-β-D-Glucopiranosse	4,64/ 96,0	4,64/ 96,0	4,64/ 95,9	4,65/ 95,8	4,64/ 95,9	-	4,64/ 95,9	4,64/ 95,9	-	-	-	-
α-D-Glucopiranosse-(1→	-	5,33/ 99,7	5,33/ 99,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
→4)-α-D-Glucopiranosse-(1→	5,37/ 99,8	5,37/ 99,7	5,37/ 99,8	5,37/ 99,7	5,37/ 99,7	-	5,37/ 99,7	5,37/ 99,7	-	-	-	-
Monossacarídeos												
α-D-Glucopiranosse	5,23/ 92,1	5,23/ 92,1	5,23/ 92,1	5,23/ 92,0	5,23/ 92,1	5,22/ 92,1	5,22/ 92,0	5,22/ 92,1	-	-	-	5,22/ 92,1
β-D-Glucopiranosse	4,64/ 96,0	4,64/ 96,0	4,64/ 95,9	4,65/ 95,8	4,64/ 95,9	4,64/ 96,0	4,64/ 95,9	4,64/ 95,9	4,63/ 96,0	-	-	-
α-D-Galactopiranosse	-	-	-	-	-	-	-	-	5,26/ 92,3	-	-	5,26/ 92,3
β-D-Galactopiranosse	-	-	-	-	-	-	-	-	5,47/ 96,6	-	-	4,57/ 96,5
α-D-Manopiranosse	5,18/ 94,0	5,18/ 94,0	5,18/ 93,9	-	5,17/ 94,0	5,17/ 93,8	-	5,17/ 94,0	5,18/ 93,9	-	-	5,17/ 94,0
β-D-Manopiranosse	4,89/ 93,8	-	-	-	4,89/ 93,6	-	-	4,89/ 93,7	-	-	-	4,89/ 93,8

4.1.9 Análise Termogravimétrica da Biomassa Residual, Extrato Aquoso e Fração “E” dos cultivos autotróficos

A biomassa residual, proveniente da extração aquosa, extrato aquoso e a fração E, obtidos a partir da microalga *D. subspicatus*, cultivada nos meios WC, CHU e BG11, foram, assim como as biomassas microalgais brutas, avaliadas quanto as suas características de degradação térmica. As análises termogravimétricas foram realizadas nas mesmas condições que para as biomassas microalgais brutas, descritas no item 4.1.5 (atmosfera de nitrogênio, 25 – 800°C, 10 °C min⁻¹).

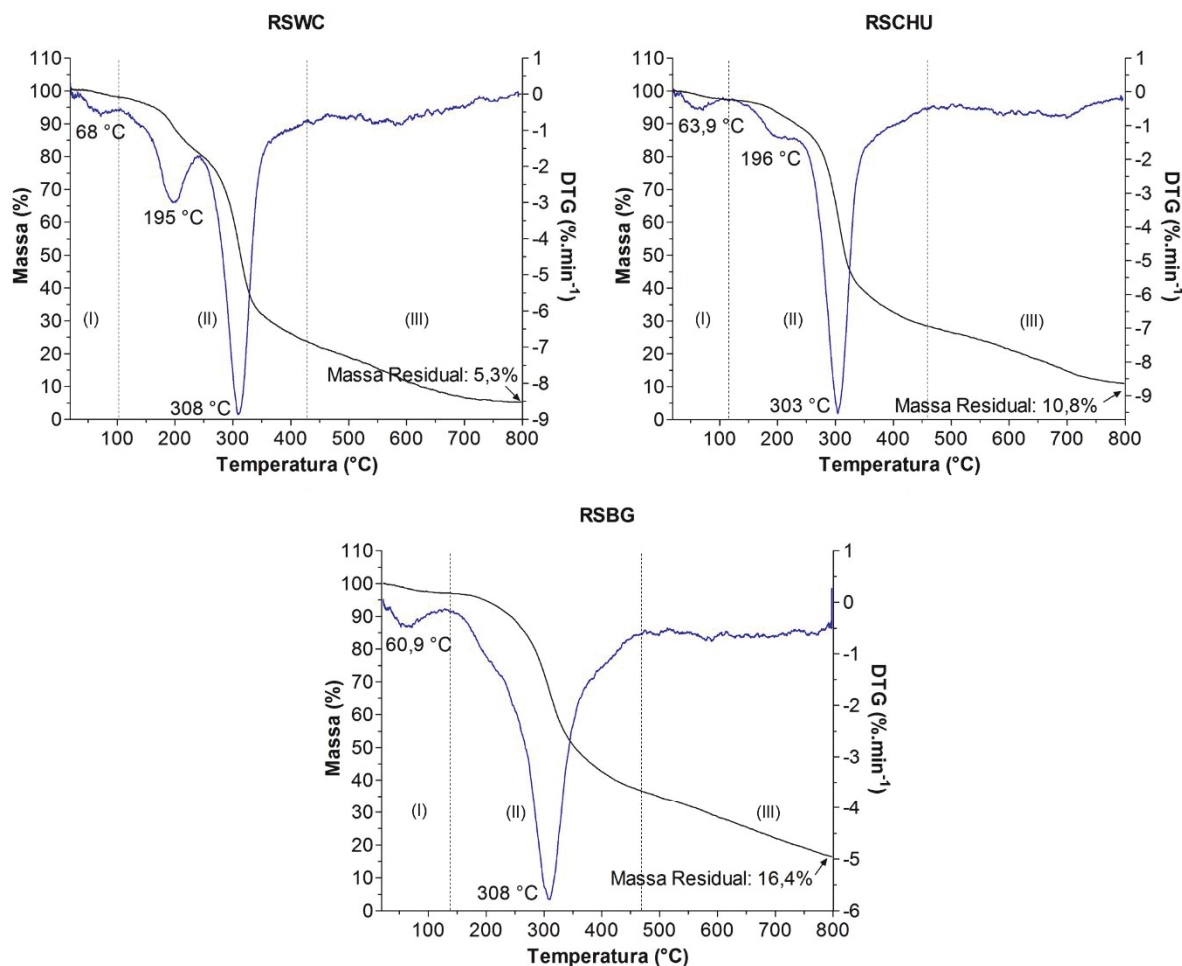
Observa-se que as amostras do resíduo da extração aquosa, denominados de RS (Figura 34) apresentaram perfil de degradação térmica com três estágios distintos. A degradação da primeira etapa (I) ocorreu entre 31,2 – 106 °C (RSWC), 31,9 – 116 °C (RSCHU) e 26,9 – 125 °C (RSBG11) com perdas de massa de 1,3; 2,8 e 8,3%, respectivamente, correspondes à eliminação de água.

A segunda etapa (II) de degradação ocorreu entre 106 – 420 °C (SWC), 107 – 463 °C (RSCHU) e 126 – 465 °C (RSBG11), e corresponde as maiores perdas de massa, com 75,2, 69,2 e 60%, respectivamente. As biomassas residuais são compostas por proteínas (RSWC: 5,9%; RSCHU: 14,7%; RSBG: 23,2%) e carboidratos (RSWC: 16,8%; RSCHU: 16,34%; RSBG: 11,28%), além de conterem lipídios que não são extraídos pelo método de extração utilizado (extração aquosa a frio).

Observa-se no termograma da fração RSWC, dois eventos principais nesse estágio, com temperaturas máximas de degradação em 195 e 308 °C. Sua biomassa de origem, biomassa microalgal obtida em meio WC, apresentou nessa mesma região também dois eventos, com temperaturas máximas de degradação em 218 e 297 °C. Ao comparar os teores de carboidratos (WC: 37,8%; RSWC: 5,9%) e proteínas (WC: 7,4%; RSWC: 16,8%) entre as biomassas de origem e os resíduos obtidos após a extração aquosa, é possível verificar quedas de 20,8 e 55,6% nos teores de proteínas e carboidratos, indicando que o processo de extração foi efetivo para a extração de carboidratos. Esses dados são refletidos diretamente nos termogramas obtidos, uma vez que o resíduo da extração concentrou proteínas e lipídeos, permitindo inferir que o evento em 195 °C corresponde a dissociação/degradação de carboidratos residuais e dissociação de estruturas

quaternárias de proteínas, e o evento em 308 °C corresponde à degradação da parte proteica e lipídios.

FIGURA 34 - TERMOGRAMAS DAS BIOMASSAS RESIDUAIS DA EXTRAÇÃO AQUOSA (RS) OBTIDOS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO (TG —; DTG —)



Kebelmann et al. (2013) analisaram a pirólise de biomassas brutas, extratos proteicos e lipídicos de *Chlamydomonas reinhardtii* e *C. vulgaris*. Os resultados obtidos permitiram identificar temperaturas de degradação máximas de 300 e 410 °C, correspondentes a degradação de cadeias de hidrocarbonetos de ácidos graxos constituintes de lipídios, e temperaturas máximas de 320 e 350 °C correspondentes a degradação de proteínas. Hu et al. (2015) analisou o comportamento térmico de biomassas de *Chlorella pyrenoidosa* e cianobactéria. As biomassas continham teores de proteínas próximos a 60%, e os termogramas obtidos apresentaram eventos em 308 °C, assim como os encontrados no presente estudo.

A amostra RSBG, apresentou apenas um único pico acentuado em 308 °C, no entanto de acordo com sua composição, seu percentual de proteínas (23,2%) é maior que os encontrados nas demais biomassas residuais analisadas, e o inverso ocorre para o teor de carboidratos (11,3%), onde o teor é menor que os encontrados nas demais frações. Em comparação com sua fração de origem (biomassa obtida em meio BG) é possível observar um aumento na temperatura de degradação máxima, de 286 °C na biomassa microalgal bruta para 308 °C na biomassa residual, o que corrobora com os dados descritos anteriormente.

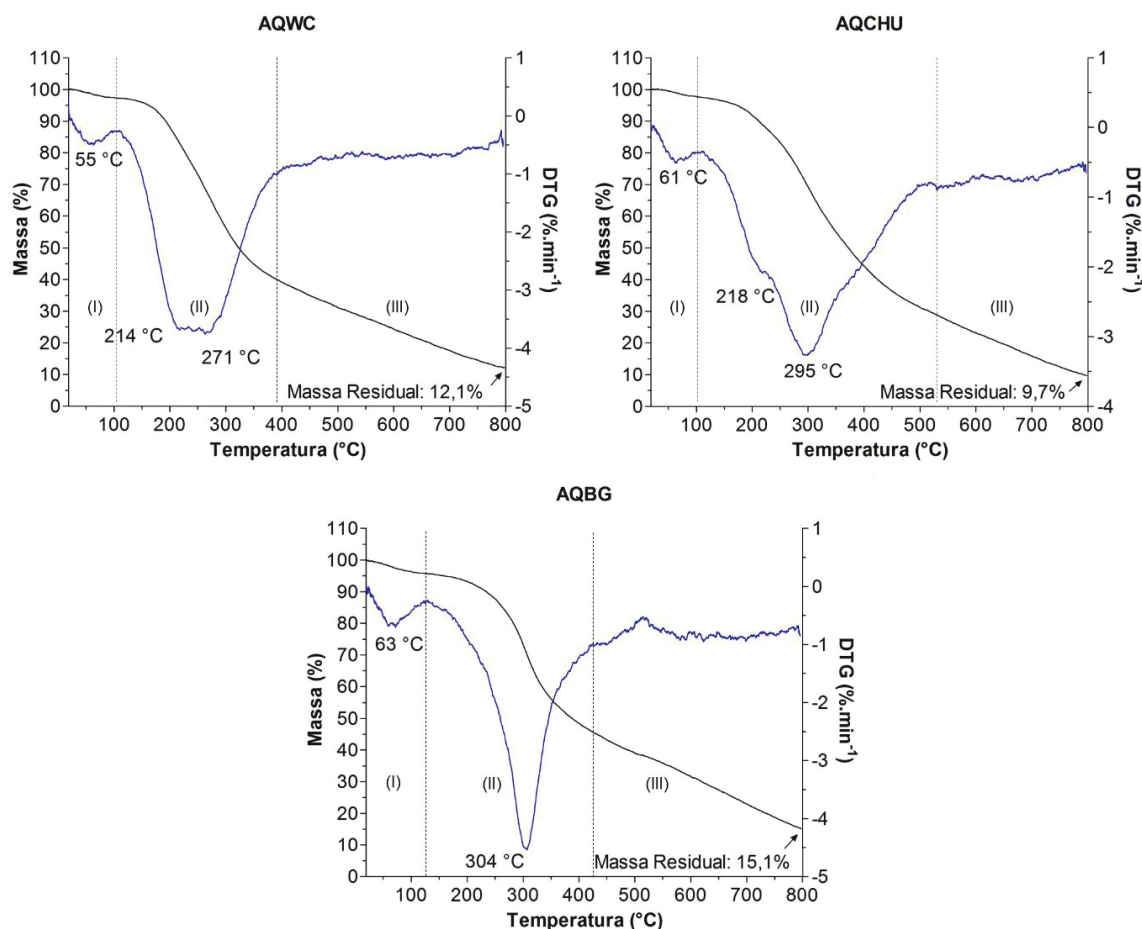
A terceira etapa (III) de degradação ocorreu entre aproximadamente 420 °C e a temperatura final de 800 °C. Os teores de cinzas obtidos para as frações foram 5,3% (AQWC), 10,8% (AQCHU) e 16,4% (AQB_{G11}). Esses resultados são levemente inferiores aos obtidos para as biomassas microalgais brutas, indicando que parte do conteúdo não degradado é solúvel em água e permaneceu nos extratos aquosos.

Para as amostras dos extratos aquosos denominados de AQ (Figura 35), a degradação da primeira etapa (I) ocorreu entre 21,5 – 107 °C (AQWC), 23,7 – 102 °C (AQCHU) e 22,2 – 124 °C (AQB_G), com perdas de massa de 3,1, 2,4 e 4,6%, respectivamente.

A segunda etapa (II) de degradação ocorreu entre 109 – 394 °C (AQWC), 102 – 527 °C (AQCHU) e 126 – 425 °C (AQB_G), correspondendo a perdas de massa de 51,2; 68,7 e 50,4%, respectivamente. As frações AQWC e AQCHU, ampla faixa de degradação durante a segunda etapa, com um evento principal formado por dois ombros, com temperaturas máximas em 214 e 271 °C, e 218 e 295 °C, respectivamente. De acordo com a composição química, as frações AQWC e AQCHU apresentam maiores teores de carboidratos (18,1 e 29,7%, respectivamente), e menores teores de proteínas (3,17 e 15,5%, respectivamente), assim como os resultados obtidos para as biomassas brutas.

Já a fração AQB_G, diferentemente, apresentou um termograma com evento único nessa fase, e máxima degradação em 304 °C, termograma este, bastante similar ao apresentado para biomassa residual derivada do mesmo meio de cultivo (RSBG). A fração AQB_G apresenta maior teor de proteínas, 14,5%, e menor teor de carboidratos, 11,9%, assim como encontrado para a fração RSBG, justificando desta forma, a similaridade entre os termogramas obtidos.

FIGURA 35 - TERMOGRAMAS DOS EXTRATOS AQUOSOS (AQ) OBTIDOS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO (TG —; DTG —)



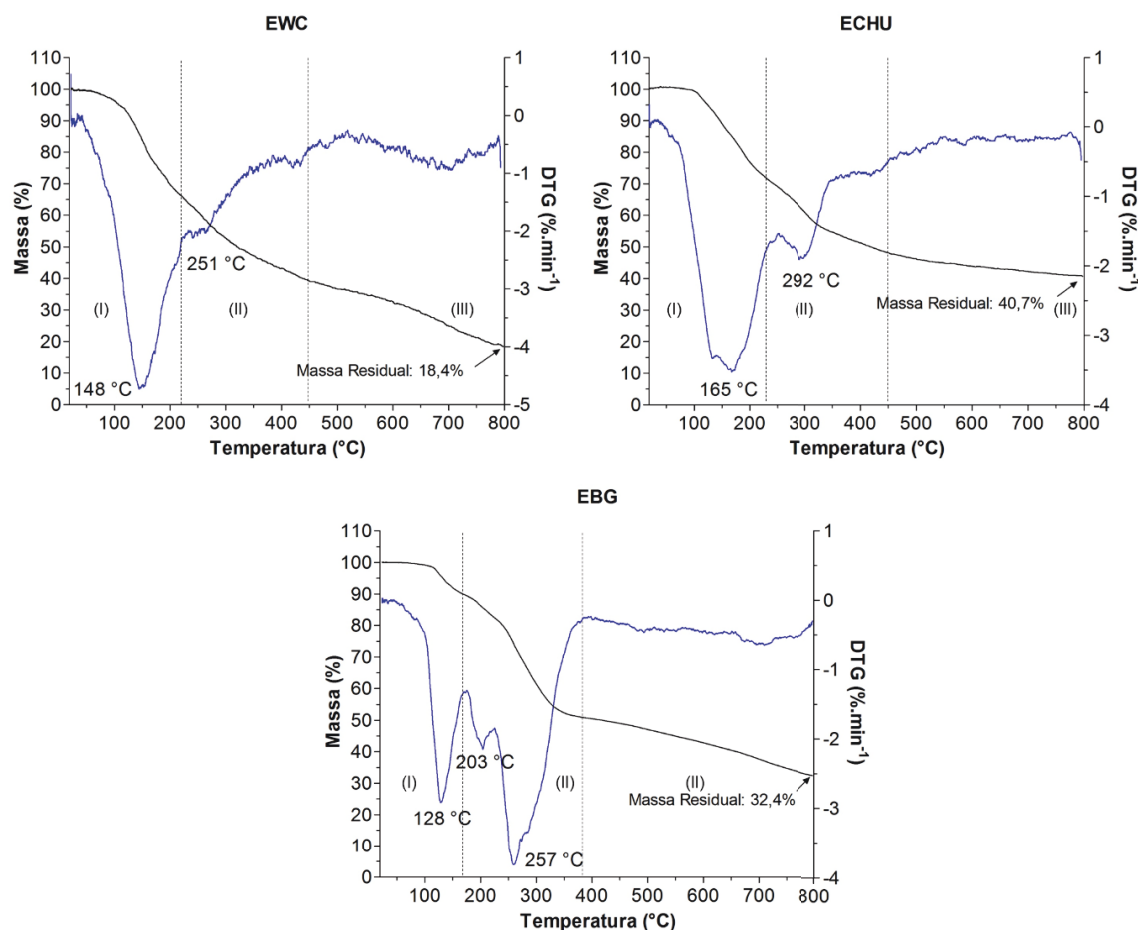
A terceira etapa (III) de degradação ocorreu entre aproximadamente 450 °C e a temperatura final de 800 °C. Os teores de cinzas encontrados foram 12,1% (AQWC), 9,7% (AQCHU) e 15,1% (AQBG), similares aos obtidos para as biomassas residuais.

Os resultados obtidos, nesse trabalho, mostram que a parte glicídica destas frações são termicamente mais lábeis e decompõem primeiro em comparação às proteínas, uma vez que as temperaturas de degradação máximas são menores quando os teores de carboidratos estão mais elevados. Essa diferença de labilidade entre a parte glicídica da fração e parte proteica, foi igualmente observada por Marcilla et al. (2009) quando analisaram biomassa e extratos da microalga *Nannochloropsis* sp., inferindo, a partir de comparações entre termogramas e análises por infravermelho, que em ordem, ocorre a degradação de carboidratos, proteínas e lipídios. O mesmo foi visualizado por Machado (2015) ao analisar extratos aquosos das microalgas *Pavlova gyrams* e *Pavlova lutheri*, onde observou-

se dois eventos principais centrados em 270 e 310 °C correlacionados à degradação térmica de carboidratos e proteínas, respectivamente.

As frações E foram também analisados quanto ao perfil de degradação térmica (Figura 36). A degradação da primeira etapa (I) ocorreu em 20 – 220 °C (EWC), 34,8 – 251 °C (ECHU) e 25,7 – 172 °C (EBG) com perdas de massa de 43,2; 31,3 e 10,6% respectivamente. Estas frações são altamente higroscópicas, razão que justifica as altas perdas de massa inicial, com picos máximos em 148, 165 e 128 °C.

FIGURA 36 - TERMOGRAMAS DAS FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO (TG —; DTG —)



A segunda etapa (II) de degradação ocorreu entre 220 – 450 °C (EWC), 255 – 351 °C (ECHU) e 171 – 390 °C (EBG), correspondendo a perdas de massa de 26,4 14,0 e 38,5 %, respectivamente. Essas frações são compostas majoritariamente por carboidratos (EWC: 25,9%; ECHU: 18,6%; EBG: 12,85%), apresentando baixíssimos conteúdos de proteínas (EWC: 4,8%; ECHU: 2,4%; EBG:

2,1%). De modo geral, as análises de RMN indicaram a presença de glicosídeos (Sulfoquinovosil-glicerol, Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol) e monossacarídeos em todas as frações, e adicionalmente a presença de oligossacarídeos nas frações EWC e ECHU.

Correlacionando a composição química dessas frações e os eventos encontrados nos termogramas, é possível observar que os resultados obtidos corroboram com outros trabalhos disponíveis na literatura, onde foram analisadas moléculas semelhantes. Paulina et al. (2017) compararam a degradação de biomassas da macroalga *Enteromorpha* e do glicerol, e identificaram temperaturas de degradação máxima de 228 °C para moléculas de glicerol. Fernandes et al. (2017) analisaram biomassas de *Nannochloropsis gaditana*, *Rhodomonas marina* e *Isochrysis* sp. cultivadas em diferentes meios de cultura. Os termogramas obtidos para as biomassas evidenciaram uma temperatura máxima de degradação de 250 °C. Análises químicas revelaram a presença de monossacarídeos de manose, galactose e glucose na composição glicídica dessas biomassas.

Os teores de cinzas encontrados foram 18,4% (EWC), 40,7% (ECHU) e 32,4% (EBG), teores estes superiores aos demais encontrados nas frações analisadas, indicando a presença de alta quantidade de elementos inorgânicos. O processo de obtenção da biomassa microalgal bruta inclui o cultivo em meios enriquecidos com micro e macronutrientes, seguido de centrifugação a 2607 x g por 15 min a 4°C, e liofilização. Não é realizado nenhuma etapa de lavagem da biomassa bruta anteriormente ao processo de extração aquosa. Com base nisso, é possível sugerir que o alto conteúdo inorgânico encontrado seja derivável dos meios de cultura utilizados.

4.1.10 Determinação da Atividade Bioestimulante Vegetal

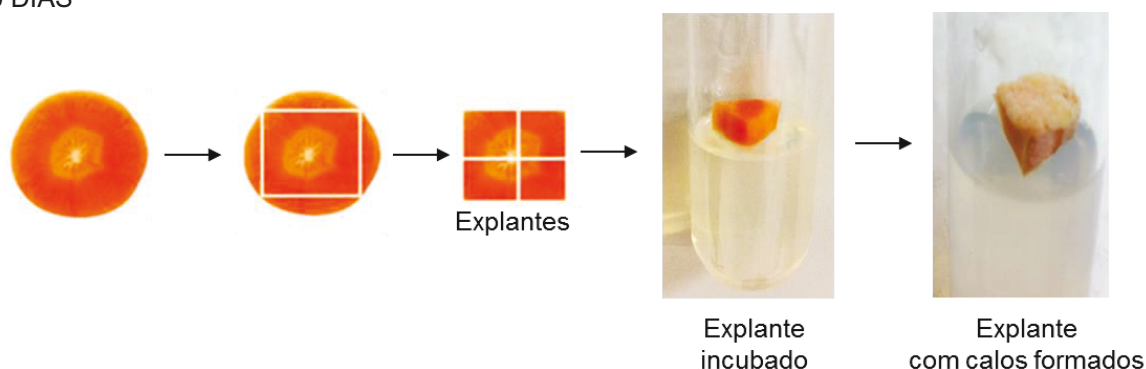
4.1.10.1 Cultivo *in vitro* de Explantes de Cenoura (*Daucus carota*)

Dentre as técnicas de micropropagação, a embriogênese somática é amplamente utilizada na biotecnologia vegetal para cultura de tecidos *in vitro*, onde sob condições controladas, pequenos fragmentos de tecido vivo isolados de um organismo vegetal, denominados explantes, se desenvolvem até a formação de embriões somáticos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). A técnica se dá através de via

direta, onde ocorre a formação do embrião a partir do explante, ou via indireta, onde ocorre a formação do embrião a partir de um calo formado no explante (FIGUEROA et al., 2006). A resposta mais comum em um tecido cultivado *in vitro* é a formação de calos, que se caracterizam por uma massa desorganizada de células indiferenciáveis (AMARAL, 2003). De acordo com George, Hall e Klerk (2008), a formação de calos é uma resposta ligada a intensa atividade citocinética (divisão celular) em tecido vegetal.

Entre os diferentes tecidos de explantes utilizados para indução da embriogênese somática, a cenoura (*D. carota*) é altamente responsiva, pois qualquer parte pode ser utilizada para estabelecer culturas embriogênicas (JIMÉNEZ, 2005). Dessa forma, o presente estudo avaliou, após 30 dias de incubação, explantes de cenoura cultivados em meios MS suplementados com a fração EBG em diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹) quanto a porcentagem de formação de calos (Figura 37).

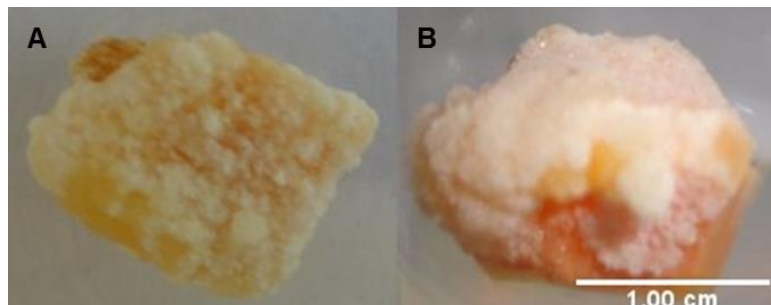
FIGURA 37 - PROCESSO DE INOCULAÇÃO DOS EXPLANTES E FORMAÇÃO DE CALOS APÓS 30 DIAS



A escolha do meio para realização desse bioensaio foi decorrência dos resultados de produção de biomassa e produção de *trans*-zeatina, uma vez que é necessária grande quantidade de material para sua realização. O meio BG11 apresentou melhor rendimento de biomassa (0,65 g L⁻¹) quando comparado aos demais meios analisados (CHU: 0,56 g L⁻¹, WC: 0,48 g L⁻¹), e sua fração E correspondente (EBG) resultou em uma produção de 9,50 µg/g DW, não apresentando diferença significativa quando comparada a fração ECHU (9,97 µg/g DW) que obteve maior produção de *trans*-zeatina/biomassa.

A Figura 38 evidencia o aspecto dos calos induzidos em explantes de cenouras pela fração EBG. De modo geral, os calos se apresentaram compactos com coloração clara, levemente amarelada.

FIGURA 38 - ASPECTO DOS CALOS NO EXPLANTE DE CENOURA SUPLEMENTADO COM FRAÇÃO EBG

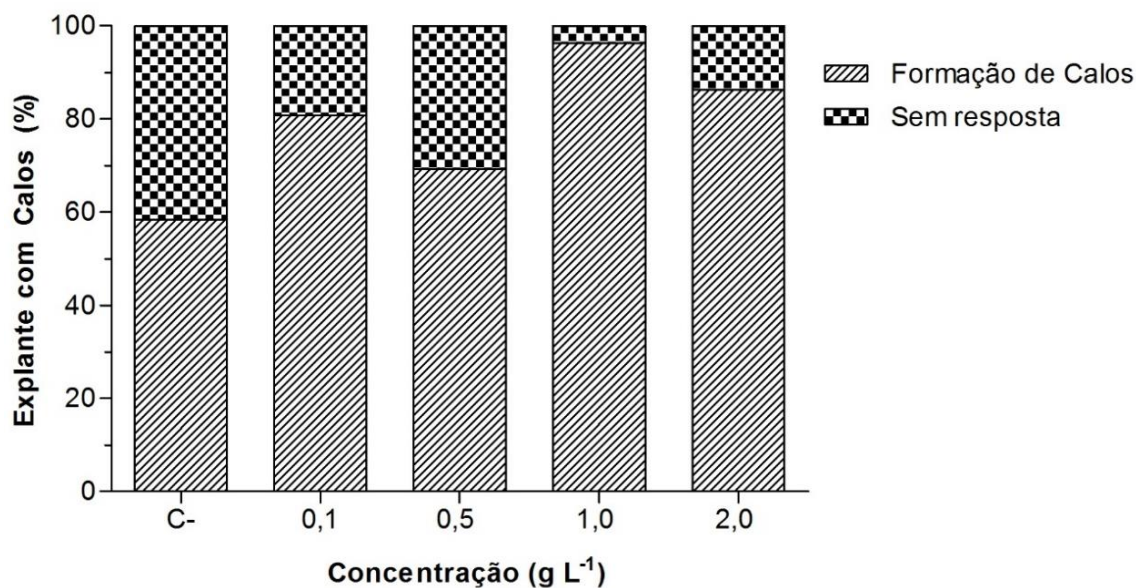


NOTA: A;B: calos compactos com coloração clara.

Observa-se formação de calos em todas as concentrações, com percentuais de indução dos explantes entre 69,2 a 96,3%. A suplementação com $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de fração EBG gerou a maior resposta, atingindo 96,3% de indução de calos nos explantes. A suplementação com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de EBG gerou uma resposta de indução de 86,2%, seguido pelas concentrações de 0,1 e $0,5 \text{ g L}^{-1}$, que induziram calos em 80,8 e 69,3% dos explantes, respectivamente. Para o controle, a porcentagem de indução de calos foi 58,3%, resultado inferior aos obtidos para a fração EBG. Não foi possível observar relação linear entre as concentrações analisadas e o percentual de formação de calos nos explantes. A Figura 39 compila todos os resultados obtidos neste experimento.

O meio nutritivo, onde os explantes são cultivados, é um dos fatores que determina o sucesso da propagação *in vitro* (AKHTAR et al., 2000). A composição do meio, além de conter substâncias essenciais ao desenvolvimento dos tecidos, permite controlar o padrão do desenvolvimento *in vitro*. Assim, modificações específicas na composição do meio de cultura, como a adição de auxinas e citocininas, influenciam fortemente a embriogênese somática e aumentam a frequência de regeneração vegetal (NISHIWAKI et al., 2000; COLOMBA et al., 2006; FUJIMURA, 2014).

FIGURA 39 - PORCENTAGEM DE RESPOSTA PARA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE CENOURA SUPLEMENTADOS COM A FRAÇÃO EBG



NOTA: Resultados foram expresso como média (n = 40).

A fração EBG estudada, apresentou em sua composição um teor de *trans*-zeatina (citocinina) 6,15 µg/g de fração E e traços de AIA (auxina), dessa forma, as concentrações analisadas de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹, continham 0,39; 1,97; 3,95 e 7,90 nM de *trans*-zeatina, respectivamente. De acordo com Takahashi (2002), meios de cultivo contendo altas concentrações de auxinas e baixas concentrações de citocininas induzem à formação de raiz; o inverso, baixas concentrações de auxina e altas concentrações de citocininas, induzem à formação de brotos; enquanto concentrações intermediárias resulta em proliferação celular desorganizada, como calos.

Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho com concentração de zeatina similares foram obtidos por Paramageetham, Babu, Rao (2004), em que meios de cultivo suplementados com diferentes combinações e concentrações de auxinas (AIA, ácido α-naftalenoacético) e citocininas (cinetina, 6-benzilaminopurina), estimularam abundantemente a formação de calos embriogênicos em explantes foliares de *Centella asiatica* L. Em estudo realizado por Flores, Nicoloso, Vasconcellos (2006) foi observado a formação de calos embriogênicos em explantes de *Pfaffia tuberosa* (Ginseng-brasileiro) ao suplementarem o meio com 10 µM de ácido α-naftalenoacético (auxina) e 1 µM de 6-benzilaminopurina (citocinina).

Fujimura e Komamine (1975) observaram o efeito de diversos fitormônios em diferentes concentrações, na formação de embriões, cultivados a partir de calos

de cenoura. Nesse estudo foi possível observar que a zeatina quando adicionada ao meio em concentração de 0,1 μM , promoveu embriogênese. Zeatina quando combinada com outros fitormônios como AIA e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) também apresentaram efeito positivo. Em outro estudo realizado por Fujimura e Komamine (1980), onde testaram o efeito da adição de citocininas (zeatina e ácido 2,4-diclorofenoxiacético) em diferentes estágios embriogênicos em células suspensas de cenoura, observaram que ao adicionar *trans*-zeatina no 3° e 4° dia de cultivo, foi possível obter um efeito positivo de 270% no número de embriões formados, em relação ao controle que não continha fitormônios. O estudo concluiu que a promoção da embriogênese por *trans*-zeatina pode ser causada pelo efeito estimulante na divisão celular no início da cultura.

Estudos também já evidenciaram a aplicação de diversos extratos de macroalgas em técnicas de micropropagação vegetal (VINOTH; GURUSARAVANAN; JAYABALAN, 2014; SATISH et al., 2015, 2016; ESSERTI et al., 2017) por serem amplamente utilizadas como bioestimulante (CRAIGIE, 2011), e conter em sua composição classes de fitormônios como as citocininas (STIRK et al., 2003) e auxinas (STIRK et al., 2004). Existem estudos de micropropagação utilizando o meio filtrado do cultivo de microalgas (SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2009; GOLLO et al., 2016), entretanto, até o momento, não foi encontrado nenhum estudo na literatura reportando o uso de extrato aquoso de microalgas para aplicação em técnicas de micropropagação.

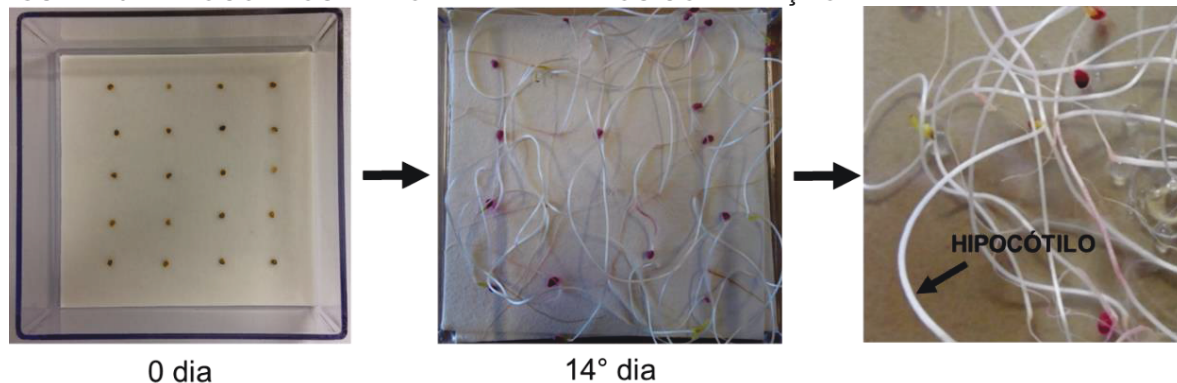
No presente estudo não foi realizada análise histoquímica para determinar se os calos obtidos eram ou não embriogênicos. No entanto, os resultados obtidos nos bioensaios sugerem que a formação dos calos foi influenciada pelos fitormônios presentes na amostra testada, evidenciando assim, o potencial de aplicação apresentado pelos extratos de microalgas na área da micropropagação.

4.1.10.2 Bioensaios com Sementes de Tomate (*Solanum lycopersicon*)

As frações de baixa massa molar (< 1 kDa) EWC, ECHU e EBG, eluídas por diálise, foram avaliadas, por meio de bioensaios com sementes de tomate, quanto a sua capacidade em estimular o crescimento vegetal. Diferentes concentrações das frações foram avaliadas (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹). Água ultrapura foi utilizada como controle negativo, e ACADIAN™ (extrato de macroalgas comercialmente disponível)

como controle positivo. Após 14 dias de tratamento (Figura 40), comprimento (cm) e volume (cm³) dos hipocótilos de tomate foram avaliados.

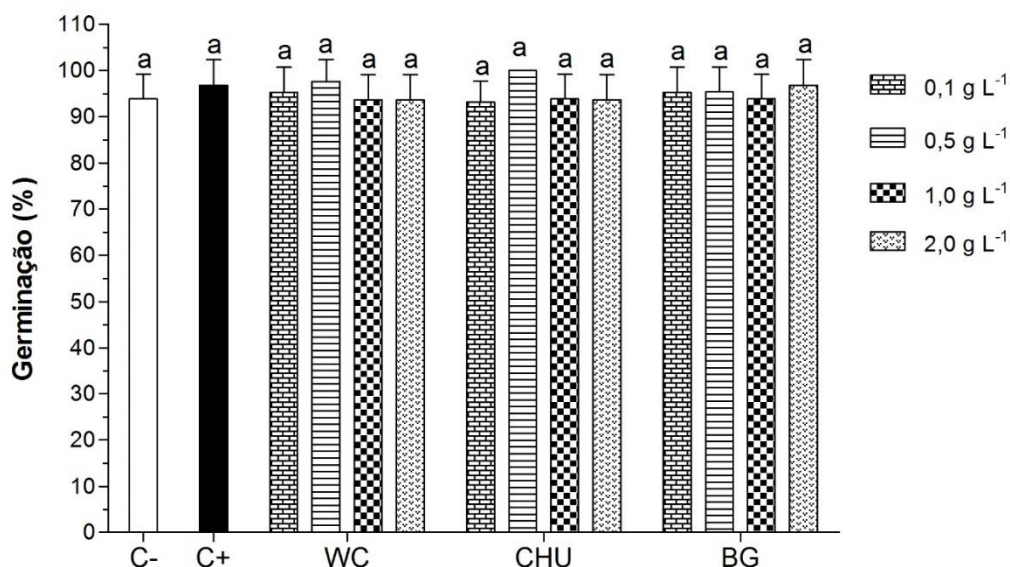
FIGURA 40 - HIPOCÓTILOS DE TOMATE TRATADOS COM FRAÇÃO “E”



Todas as frações foram analisadas em três ensaios independentes, em quadruplicata. O coeficiente de variação médio intra e inter ensaios, para as variáveis comprimento (cm) e volume (cm³) foram, respectivamente, de 8,9 e 9,1%, valores próximos aos encontrados por Mazepa (2013) (6,07% para comprimento e 7,39% para volume) e Mógor et al. (2011) (14,51% para volume). O coeficiente de variação reflete a precisão do experimento uma vez que mede percentualmente a relação entre o desvio padrão e a média aritmética. Segundo Ferreira (1991) e Gomes (2000), coeficientes de variação inferiores a 10%, em experimentos agrícolas, representam ótima precisão.

Quando avaliadas em relação ao percentual de sementes germinadas (Figura 41), não houve diferença significativa, mostrando que os nenhum dos tratamentos prejudicaram o processo de germinação, que ocorreu em torno de 95%.

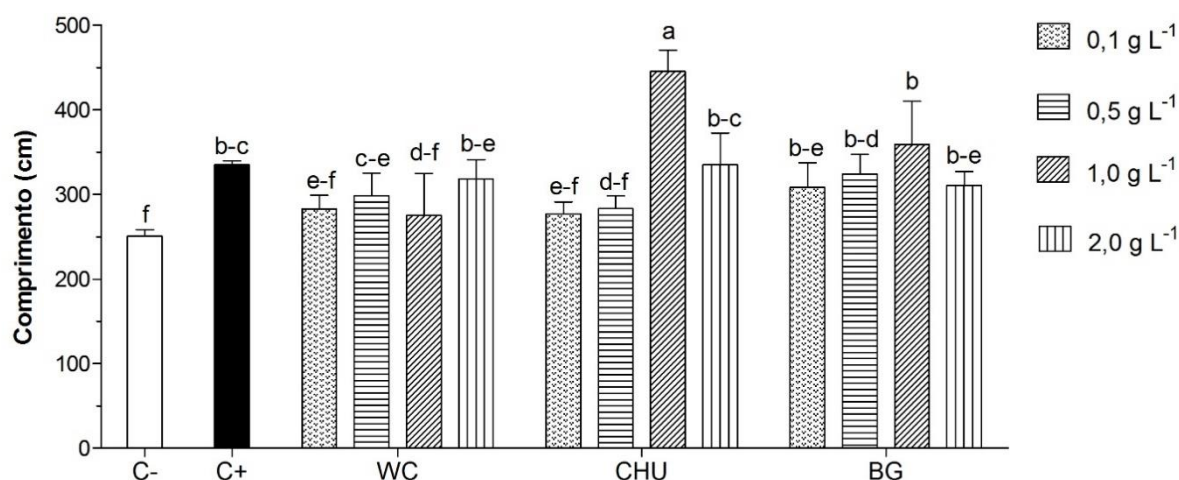
FIGURA 41 – GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE TOMATE TRATADAS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO



NOTA: C-: água ultrapura; C+: Acadian™; WC, CHU e BG: meios de origem para obtenção da fração “E”. Resultados foram expresso como média \pm DP (n = 9). Comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos para o comprimento dos hipocótilos (Figura 42), observa-se que o tratamento realizado com a fração ECHU, na concentração 1,0 g L⁻¹, contendo 4,4 nM de *trans*-zeatina, apresentou maior efeito sobre as sementes de tomate, atingindo um comprimento médio dos hipocótilos de 445,4 cm, mostrando-se diferente significativamente dos controles e todos os demais tratamentos testados. A fração EBG 1,0 g L⁻¹, contendo 3,9 nM de *trans*-zeatina, quando comparado controle positivo não apresentou diferença significativa, alcançando com um comprimento médio dos hipocótilos de 359,1 cm. Comparando-se o comprimento dos hipocótilos de cada uma das frações ao produto comercial é possível verificar com maior clareza que as frações ECHU e EBG na concentração 1,0 g L⁻¹ destacam-se das demais, atingindo, respectivamente, comprimentos 24,8 e 6,7% maiores que o controle positivo.

FIGURA 42 - COMPRIMENTO DOS HIPOCÓTILOS DE TOMATE TRATADOS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

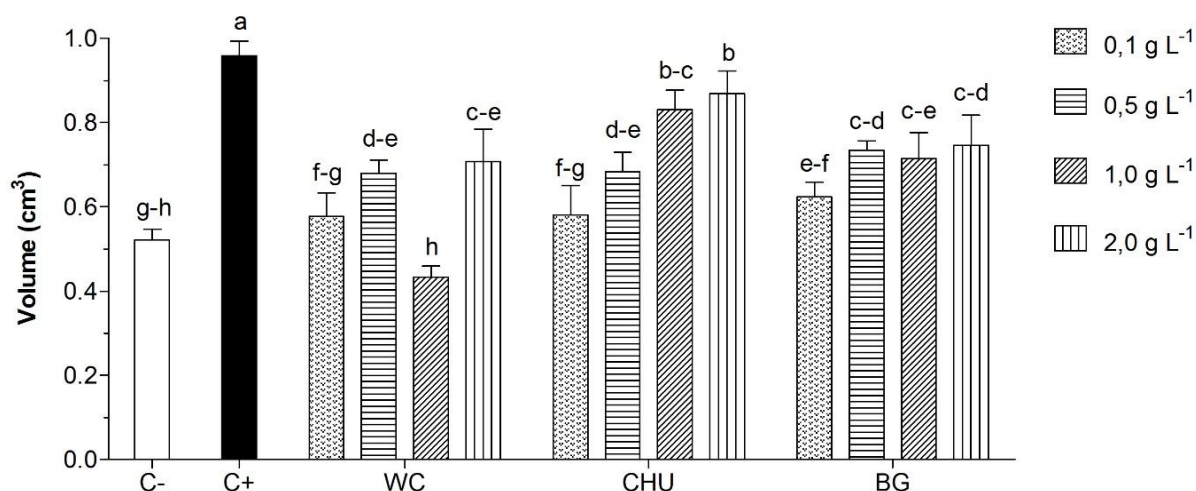


NOTA: C-: água ultrapura; C+: Acadian™; WC, CHU e BG: meios de origem para obtenção da fração “E”. Resultados foram expresso como média \pm DP (n = 9). Comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os tratamentos realizados com as frações EWC 0,5; 2,0 g L⁻¹, ECHU 2,0 g L⁻¹ e EBG 0,1; 0,5; 2,0 g L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle positivo, atingindo comprimentos dos hipocótilos entre 298,3 – 334,9 cm. Esses resultados se mostram importantes, uma vez que se apresentaram estatisticamente equiparáveis ao produto comercial quanto ao comprimento dos hipocótilos. As demais frações, EWC 0,1; 1,0 g L⁻¹; ECHU 0,1; 0,5 g L⁻¹, mostraram-se estatisticamente iguais ao controle negativo, atingindo comprimentos dos hipocótilos entre 276,1 – 283,2 cm.

Quando avaliados em relação ao volume dos hipocótilos (Figura 43), os tratamentos realizados com as frações ECHU, nas concentrações 1,0 e 2,0 g L⁻¹, contendo 4,4 e 8,8 nM de *trans*-zeatina, respectivamente, apresentaram atividades similares ao controle positivo, com volume médio dos hipocótilos entre 0,83 – 0,87 cm³. As frações EWC 0,5; 2,0 g L⁻¹, ECHU 0,5 g L⁻¹ e EBG 0,5; 1,0; 2,0 g L⁻¹, contendo entre com volumes dos hipocótilos entre 0,68 – 0,75 cm³, apresentaram efeitos significativamente 23,5 - 30,6% maiores quando comparadas ao controle negativo e 21,9 – 29,2% inferiores quando comparados ao controle positivo. As demais frações, EWC 0,1; 1,0 g L⁻¹; CHU 0,1 g L⁻¹ e BG 0,1 g L⁻¹, mostraram-se estatisticamente iguais ao controle negativo, atingindo volumes médios dos hipocótilos entre 0,50 e 0,62 cm³.

FIGURA 43 - VOLUME DOS HIPOCÓTILOS DE TOMATE TRATADOS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSAS CULTIVADAS AUTOTROFICAMENTE EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO



NOTA: C-: água ultrapura; C+: Acadian™; WC, CHU e BG: meios de origem para obtenção da fração “E”. Resultados foram expresso como média \pm DP (n = 9). Comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Comportamento bioestimulante envolvendo frações derivadas de *D. subspicatus*, foram relatados anteriormente por outros autores e corroboram com os resultados obtidos no presente estudo. Mógor et al. (2011) evidenciaram atividade bioestimulante em suspensões aquosas de *D. subspicatus*, cultivadas em meio Guillard f/2 modificado. As suspensões de microalgas estimularam o crescimento de hipocótilos de tomate em concentrações entre 0,5 – 3 g L⁻¹, atingindo áreas dos hipocótilos entre 7,91 – 11,21 cm² e volumes dos hipocótilos entre 0,41 – 0,62 cm³, sendo a concentração de 1 g L⁻¹ a que proporcionou os melhores resultados. Mazepa (2013) ao testar frações de baixa massa molar (< 1 kDa), obtidas da microalga *D. subspicatus*, cultivadas também em meio Guillard F/2 modificado, observou aumento semelhante, no comprimento e volume dos hipocótilos de tomate, quando comparados a um bioestimulante vegetal comercial proveniente de macroalgas. Os hipocótilos atingiram comprimento entre 311,1 – 326,41 cm e volume entre 0,87 – 0,97 cm³, sendo as concentrações 1 e 1,5 g L⁻¹ as que proporcionaram os melhores resultados.

O uso de bioestimulantes na agricultura, vem sendo utilizado como uma alternativa para melhorar e aumentar a produção dos cultivos em diferentes estágios, mesmo que utilizados em baixas quantidades (BATTACHARYYA et al., 2015; DU JARDIN, 2015; MORAES, 2015b; YAKHIN et al., 2017). Esses produtos

possuem uma composição diversificada, podendo conter macro e micronutrientes, aminoácidos, oligossacarídeos, antioxidantes e fitormônios (RIOUX; TURGEON; BEAULIEU, 2007; TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007; KHAN et al., 2009; CRAIGIE, 2011; COLLA et al., 2015; RENGASAMY et al., 2016).

Alguns estudos atribuem o efeito bioestimulante aos fitormônios contidos nesses extratos (STIRK et al., 2002; JÄGER et al., 2010; HUSSAIN; HASNAIN, 2011). No entanto, esses efeitos podem também estar associados a outros compostos bioativos que induzem respostas fisiológicas idênticas aos fitormônios (RAYORATH et al., 2008). Michalak et al. (2016) atribuíram a atividade bioestimulante obtida em trigo à compostos fenólicos presentes no extrato aquoso da microalga *Spirulina platensis*. De acordo com Conti et al. (2016), o efeito dos extratos bioestimulantes pode ainda ser correlacionado a fatores como: concentração, modo e tempo de aplicação, e tipo de cultivar utilizado.

Todas as frações testadas apresentam em suas composições *trans*-zeatina (citocinina), traços de AIA (auxina) e glicosídeos (Sulfoquinovosil-glicerol, Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol), malto-oligossacarídeos (α -(1→4)-Glucoligossacarídeos) e monossacarídeos (D-Glcp, D-Manp e D-Galp), conforme descrito nos itens 4.1.7 e 4.1.8. As frações ECHU e EBG, que apresentaram maior potencial bioestimulante quando analisado o parâmetro comprimento dos hipocótilos (445,4 e 359,1 cm, respectivamente), contém em sua composição teores de *trans*-zeatina de 5,63 e 6,15 µg/g de fração E, teores superiores aos encontrados na fração EWC. No entanto, não foi possível confirmar uma relação linear entre a concentração de fitormônios e a atividade bioestimulante.

Jäger et al. (2010) evidenciou comportamento semelhante ao tratar cotilédones de pepino com suspensões aquosas de diferentes microalgas e cianobactérias, nas quais foram identificadas citocinina (zeatina) e auxina (AIA). Os efeitos de aumento de massa nos cotilédones e enraizamento foram correlacionados à uma curva de atividade citocinínica e auxínica, sendo possível observar que alguns extratos responsáveis pelas maiores atividades não continham as maiores quantidades de fitormônios. Os resultados obtidos sugeriram a presença de compostos com atividade sinérgica, que elevaram a atividade bioestimulante em frações com baixos teores de fitormônios, ou inibidores, que diminuíram a atividade bioestimulante em frações com elevado teor de fitormônios.

Outros estudos, disponíveis na literatura evidenciam também a atividade bioestimulante de extratos de microalgas sobre sementes ou cotilédones. Stirk et al. (2002) estudaram a atividade bioestimulante do extrato aquoso de diferentes espécies de microalgas clorófitas sobre cotilédones de pepino. Os resultados obtidos permitiram verificar aumento na massa fresca dos cotilédones e no número de raiz. Esses efeitos foram semelhantes quando equiparados aos efeitos dos padrões de citocinina (cinetina) e auxina (ácido indol butírico). Gonzalez e Sommerfeld (2015) testaram extrato aquoso da microalga *Acutodesmus dimorphus* em sementes e plantas de tomate. Ao avaliar a aplicação do extrato nas sementes, observaram um estímulo na germinação, aumento no número de sementes germinadas e diminuição no tempo da germinação quando comparado ao controle (água). Ao realizar aplicação do extrato na planta, foi possível obter aumento na altura da planta, maior número de flores e ramos, e desenvolvimento precoce de frutos.

As citocininas estão presentes em todas as fases da germinação (NIKOLIC et al., 2006), formação de rebentos, desenvolvimento radicular (RIEFLER et al., 2006), e estão associadas a divisão e alongamento celular em plantas em diferentes estágios (SAKAKIBARA, 2006; WERNER; SCHMÜLLING, 2009). As auxinas, por sua vez, estão diretamente ligadas a influência da divisão celular, alongamento celular e diferenciação celular (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006).

Correlacionando todos os resultados obtidos e a literatura disponível, sugere-se que os efeitos positivos dos extratos de *D. subspicatus* observados sobre o comprimento e volume dos hipocótilos de tomate, estão correlacionados com a presença de *trans*-zeatina e ácido indol acético presente em todas as frações analisadas. Adicionalmente, os glicosídeos também presentes e identificados, podem estar atuando de forma sinérgica ou favorecendo a atividade bioestimulante vegetal. Em razão dos maiores teores de *trans*-zeatina e alto potencial bioestimulante apresentado pela fração ECHU, o meio CHU, do qual deriva esta fração, foi selecionado para o desenvolvimento de cultivos mixotróficos e heterotróficos, bem como bioensaios utilizando sementes de milho.

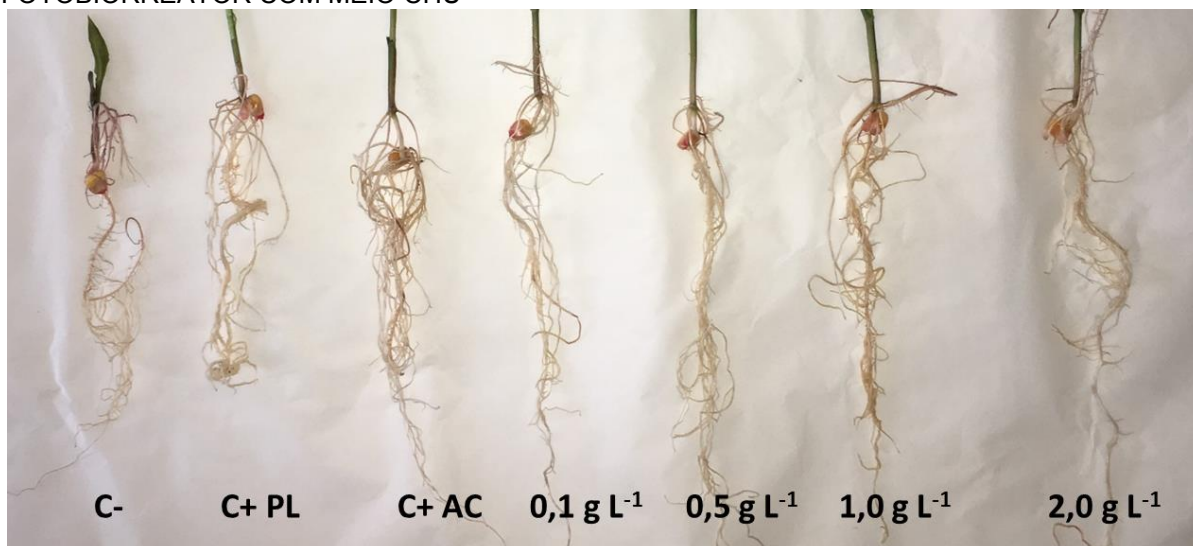
4.1.10.3 Bioensaios com Milho

A fração de baixa massa molar (< 1 kDa) EFBR CHU, eluída por diálise, foi avaliada, por meio de bioensaios com raízes de milho, quanto a sua capacidade em

estimular o crescimento vegetal. Diferentes concentrações da fração foram avaliadas (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹). Água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo, ACADIAN™ (extrato de macroalgas comercialmente disponível) e Plant Medium como controles positivos. Após 7 dias de tratamento (Figura 44), comprimento (cm) e volume (cm³) das raízes de milho foram avaliadas.

O coeficiente de variação médio intra ensaios, para as variáveis comprimento (cm) e volume (cm³) foram, para ambos, 15,4%. Segundo Ferreira (1991) e Gomes (2000), coeficientes de variação inferiores a 20%, em experimentos agrícolas, representam boa precisão.

FIGURA 44 - RAÍZES DE MILHO TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO “E” OBTIDA A PARTIR DE BIOMASSA CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM FOTOBIOREATOR COM MEIO CHU

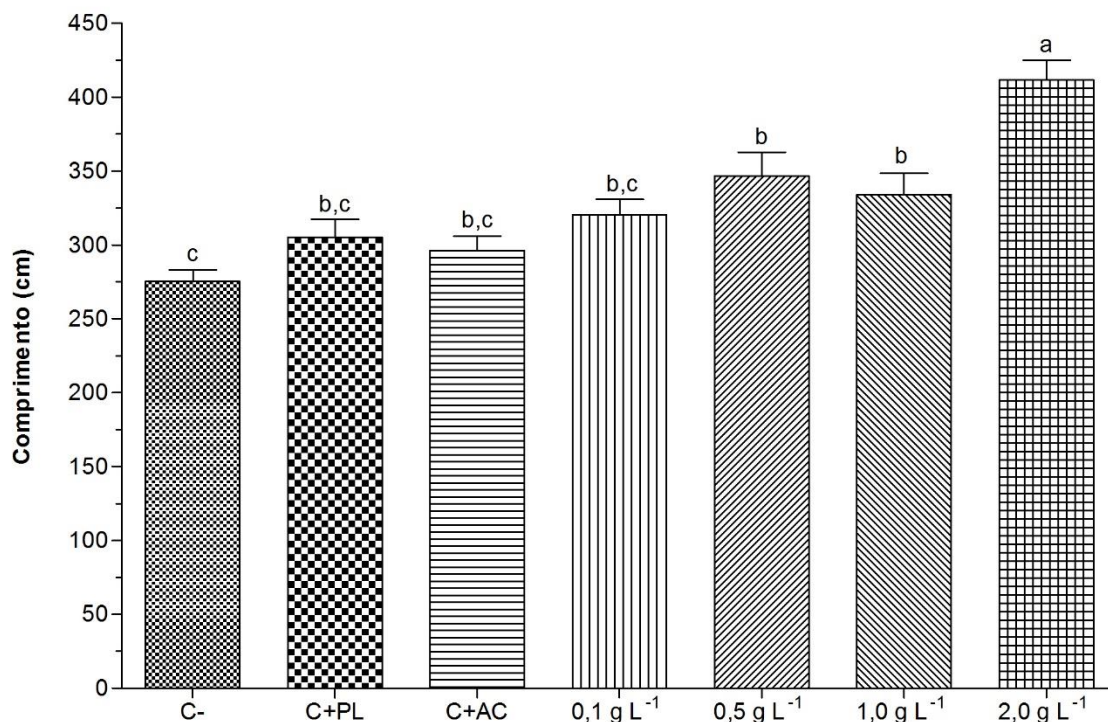


NOTA: C-: água ultrapura; C+PL: Plant Medium; C+AC: Acadian™; 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 g L⁻¹: concentrações da fração EFBR CHU.

De acordo com os resultados obtidos para o comprimento das raízes de milho (Figura 45), observa-se que os tratamentos realizados com a fração EFRB CHU, resultaram em comprimentos das raízes entre 334,0 – 411,7 cm. O melhor resultado, 411,7 cm, foi obtido na concentração de 2,0 g L⁻¹, mostrando-se diferente significativamente dos controles, negativo e positivos, e todos os demais tratamentos analisados. A fração EFBR CHU nas concentrações 0,5 e 1,0 g L⁻¹, quando comparadas aos controles positivos, não apresentaram diferenças significativas, alcançando um comprimento médio das raízes de 340,3 cm. A fração EFBR CHU na concentração de 0,1 g L⁻¹, mostrou-se estatisticamente igual quando

comparada aos controles negativo e positivos, atingindo um comprimento das raízes de 334,0 cm.

FIGURA 45 - COMPRIMENTO DAS RAÍZES DE MILHO TRATADAS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSA CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM FOTOBIOREATOR COM MEIO CHU



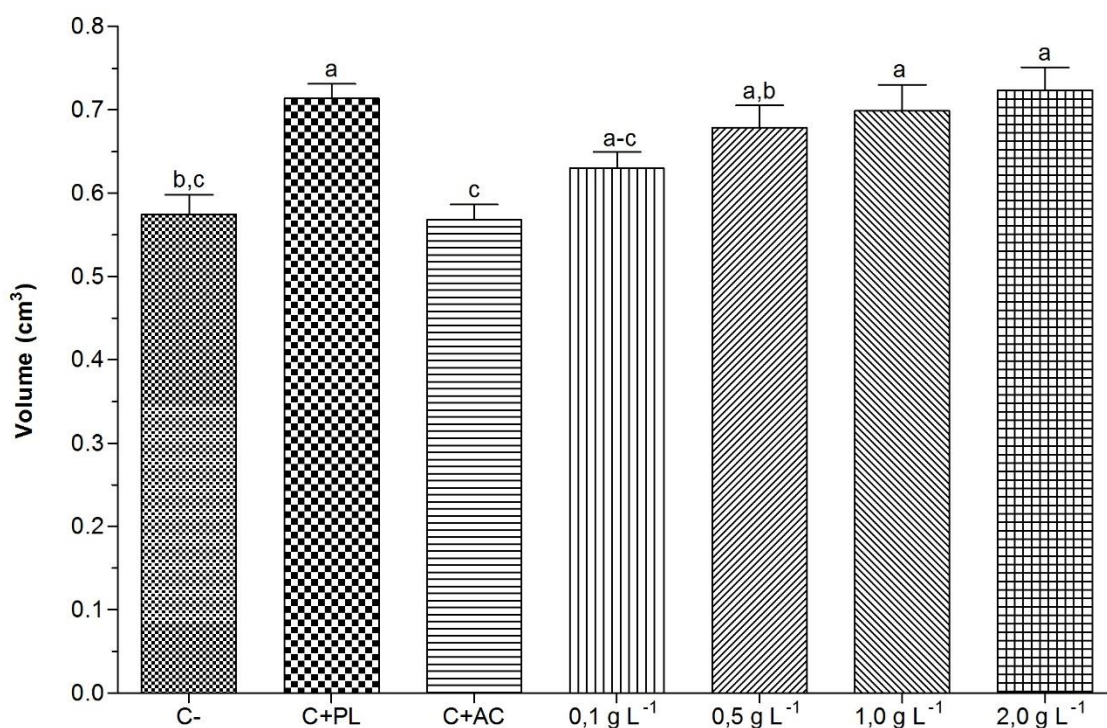
NOTA: C-: água ultrapura; C+PL: Plant Medium; C+AC: Acadian™; 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 g L⁻¹: concentrações da fração EFBR CHU. Resultados foram expresso como média ± DP (n = 20). Comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Quando avaliadas em relação ao volume das raízes de milho (Figura 46), o tratamento realizado com a fração EFBR CHU, resultaram em volume das raízes entre 0,63 – 0,72 cm³. Os volumes alcançados para as concentrações 1,0 e 2,0 g L⁻¹, não resultaram em diferenças significativas quando comparados ao controle positivo (Plant Medium), atingindo volume médio das raízes de 0,71 cm³. A fração EFBR CHU na concentração 0,5 g L⁻¹ se mostrou estatisticamente igual quando comparada aos controles negativo e positivo (Plant Medium), atingindo um volume das raízes de 0,68 cm³, enquanto a fração EFBR CHU na concentração de 0,1 g L⁻¹, mostrou-se estatisticamente igual aos controles negativo e positivo (Acadian™) atingindo um volume das raízes de 0,63 cm³.

Estudos reportaram efeitos positivos em sistemas radiculares, sendo esses mais desenvolvidos quando utilizado um bioestimulante no tratamento (WEBER,

2011; SANTOS et al., 2013; MARTINS et al., 2016). Plantas com sistemas radiculares extensos, de elevado comprimento, e raízes de menor diâmetro, apresentam uma maior capacidade para absorção de água e sais minerais disponíveis, e promovem uma exploração mais efetiva do solo, facilitando a adaptação em ambientes de baixa fertilidade com restrição de água (MACHADO; MACHADO; FURLANI, 2004; NETO et al., 2014). Desta forma, os bioestimulantes podem atuar como uma alternativa à aplicação de fertilizantes constantemente utilizados para estimular a produção de raízes especialmente em solos com baixa fertilidade e baixa disponibilidade de água (FERRINI; NICESE, 2002).

FIGURA 46 - VOLUME DAS RAÍZES DE MILHO TRATADAS COM FRAÇÕES “E” OBTIDAS A PARTIR DE BIOMASSA CULTIVADA AUTOTROFICAMENTE EM FOTOBIOREATOR COM MEIO CHU



NOTA: C-: água ultrapura; C+PL: Plant Medium; C+AC: Acadian™; 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 g L⁻¹: concentrações da fração EFBRC CHU. Resultados foram expresso como média ± DP (n = 20). Comparação estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)."

O bom desenvolvimento de plantas é dependente da razão entre fitormônios auxinas:citocininas. Níveis altos de citocininas promovem o crescimento da parte aérea, já níveis altos de auxinas, promovem o crescimento da raiz (HARTMANN et al., 2002). A fração EFBRC CHU testada apresentou em sua composição traços de AIA e teores de *trans*-zeatina de 0,72 µg/g de fração E. Dessa forma, as

concentrações analisadas de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g L⁻¹, continham 0,2; 1,0; 2,0 e 4,0 nM de *trans*-zeatina, respectivamente, sendo possível observar uma tendência linear entre a concentração de fitormônios e a atividade bioestimulante, uma vez que as maiores concentrações de *trans*-zeatina resultaram em melhores resultados, e inversamente as menores concentrações de *trans*-zeatina obtiveram resultados inferiores. Os resultados obtidos permitem sugerir que os teores de *trans*-zeatina e AIA podem estar em níveis satisfatórios para o desenvolvimento de raízes de milho, e corroboram com os resultados encontrados para os bioensaios do tomate, evidenciando o potencial bioestimulante das frações E analisadas.

4.2 AVALIAÇÃO DO CULTIVO HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

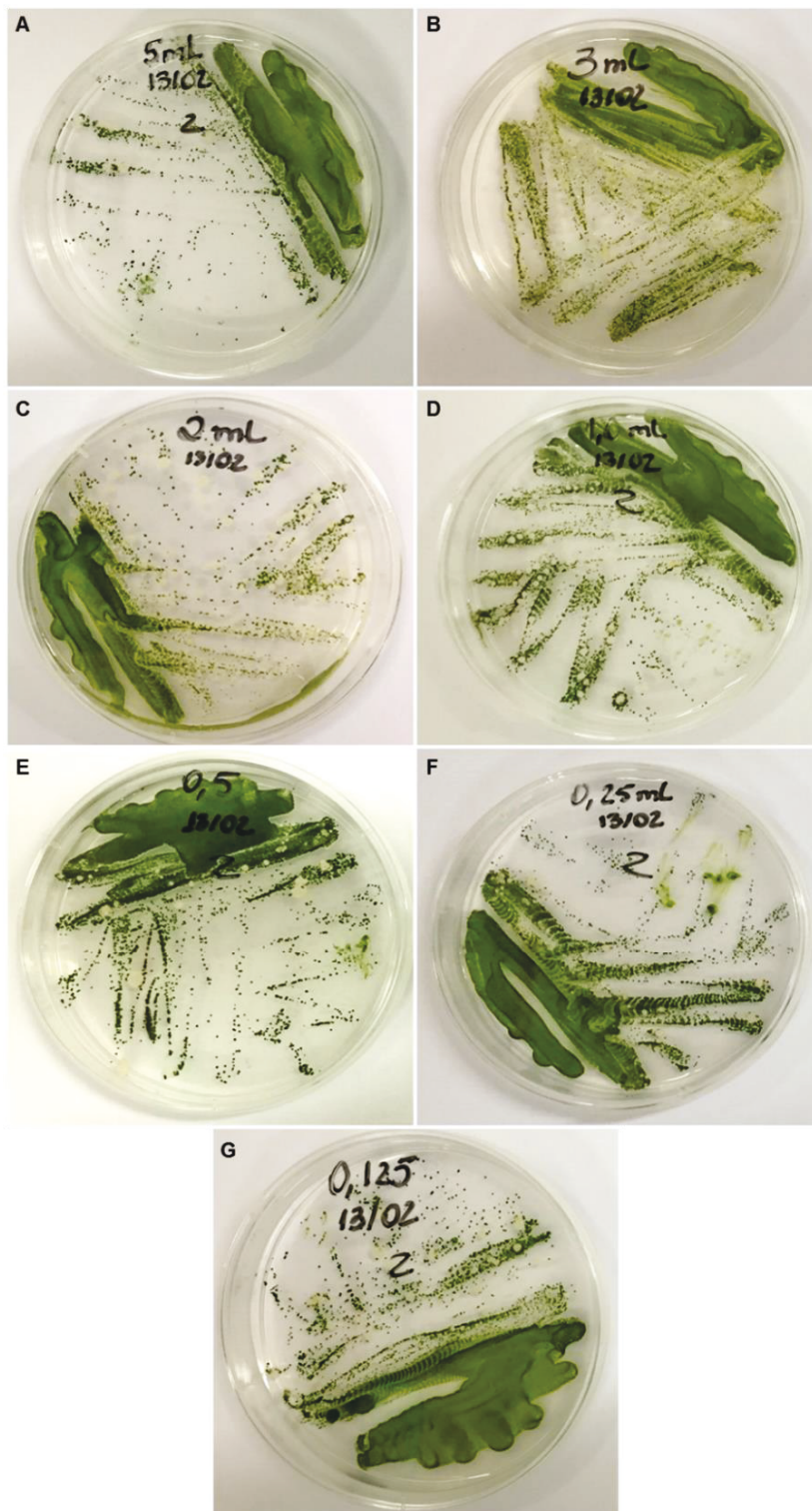
4.2.1 Obtenção da Cepa Axênica da Microalga *Desmodesmus subspicatus*

As cepas unialgais da microalga *D. subspicatus* utilizadas nos experimentos anteriores, não são axênicas e consequentemente apresentam contaminação bacteriana. Essa contaminação não afeta o cultivo autotrófico das microalgas, já que o meio não apresenta as características necessárias para o crescimento bacteriano. No entanto, no cultivo heterotrófico e mixotrófico, com a disponibilidade de fonte de carbono orgânica o crescimento bacteriano é significativo, prejudicando a produção da biomassa microalgal (PINTO, 2014). Assim, foi necessário o tratamento da cepa microalgal com antibióticos, para a obtenção de uma cepa axênica.

De modo geral, nas cepas de microalgas não axênicas, mais de uma espécie de bactérias podem estar presentes no meio, e ocasionalmente fungos. Assim, para maior eficiência do tratamento é aconselhado trabalhar com misturas de antibióticos (KAN; PAN, 2010; MOHAMED et al., 2014). Os antibióticos utilizados nesse estudo, foram selecionados a partir de resultados obtidos com a técnica de Gram. Na cepa de origem foram identificadas bactérias gram-negativas e gram-positivas (resultados não mostrados). Desta forma, antibióticos de diferentes classes foram selecionados, penicilina G (bactérias gram positivas), estreptomicina (bactérias gram negativas) e nistatina (amplo espectro de fungos), para o tratamento das cepas.

Na Figura 47, após um período de aproximadamente 20 dias, foi possível observar, nos diferentes tratamentos com antibióticos, que houve crescimento de várias colônias de bactérias, porém o crescimento microalgal não foi inibido.

FIGURA 47 - EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS COM ANTIBIÓTICOS PARA OBTENÇÃO DE CEPA AXÊNICA



NOTA: Soluções de Antibióticos A: 5 mL; B: 3 mL; C: 2 mL; D: 1 mL; E: 0,5 mL; F: 0,25 mL; G: 0,125 mL.

Análise visual dos 7 tratamentos aplicados, permitiu identificar que o tratamento com 0,25 mL da solução de antibióticos (placa F) apresentou maior inibição do crescimento bacteriano e não prejudicou o crescimento microalgal. A partir desse resultado obtido, foi possível dar continuidade a obtenção da cepa axênica.

Colônias de microalgas do tratamento com antibióticos (Placa F), foram repicadas, para meio líquido BG11, e cultivadas até o crescimento microalgal, o que ocorreu após 15 dias. Ao fim desse período, a pureza das cepas em meio líquido foi confirmada, inoculando uma pequena alíquota dessas cepas em placas de Petri, contendo meio BG11 com ágar (7 g L⁻¹) e glucose a 1% (v/v), esgotando-se o material na superfície do meio. As placas foram mantidas até crescimento das microalgas e avaliadas por três semanas quanto ao desenvolvimento de contaminantes. Não foi possível observar crescimento de outros microrganismos juntamente com as colônias de microalgas ao fim da 3^a semana (Figura 48), confirmando a obtenção de uma cepa axênica da microalga *D. subspicatus*. Esta cepa foi então utilizada nos cultivos heterotróficos e mixotróficos apresentados a seguir.

FIGURA 48 - PLACA COM CULTURA AXÊNICA DE MICROALGAS

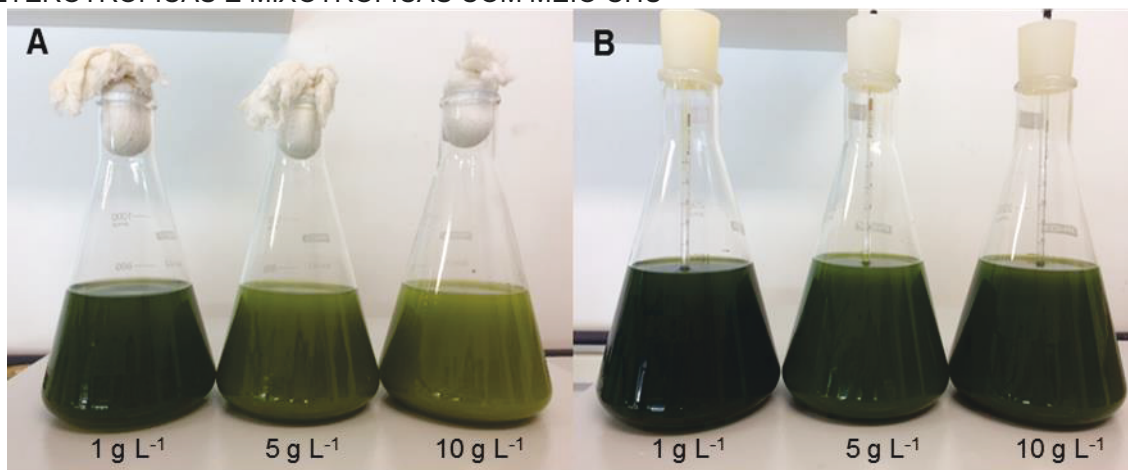


4.2.2 Análise da Cinética de Crescimento de *Desmodesmus subspicatus*

Após a obtenção da cepa axênica, a microalga *D. subspicatus* foi cultivada em meio CHU, em condições heterotróficas e mixotróficas. Os cultivos foram mantidos por 9 dias e avaliados quanto a produção de biomassa em comparação a condição autotrófica anteriormente descrita (item 3.6.1). Como fonte de carbono

para ambos os cultivos, foi utilizado glucose, nas concentrações de 1, 5 e 10 g L⁻¹ (Figura 49).

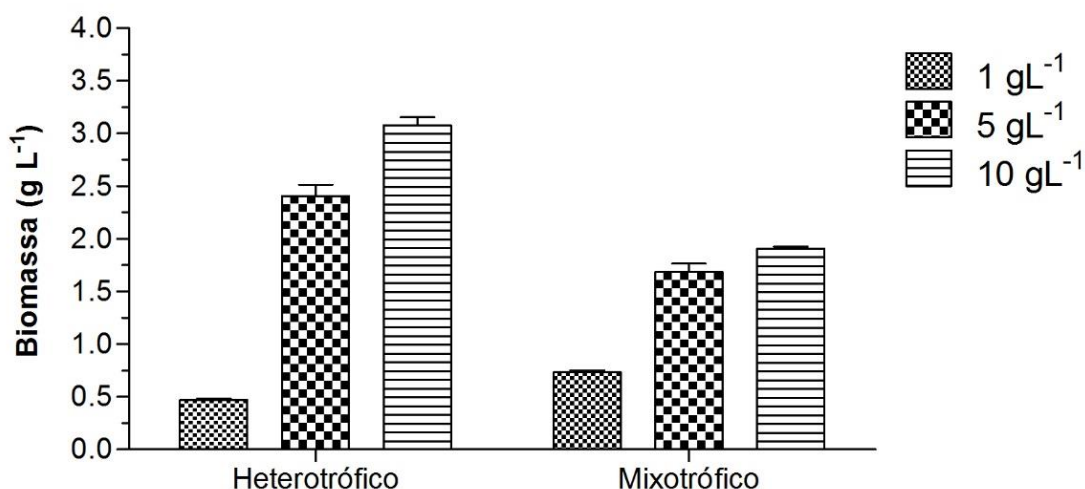
FIGURA 49 - CULTIVOS DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS COM MEIO CHU



NOTA: A: cultivos heterotróficos; B: cultivos mixotróficos; 1 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 10 g L⁻¹: quantidade de glucose adicionada em cada cultivo. Cultivos tiveram duração de 9 dias.

A escolha do meio CHU, para realização dos cultivos heterotróficos e mixotróficos, é justificada pelos resultados apresentados no item 4.1.7. Dentre os meios de cultivos testados autotroficamente (WC, CHU e BG11), o meio CHU foi o que permitiu maior produção do fitormônio *trans*-zeatina. Na Figura 50, é possível observar a produção de biomassa microalgal no meio CHU, em condições heterotróficas e mixotróficas.

FIGURA 50 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Desmodesmus subspicatus* EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS



NOTA: Resultados foram expresso como média \pm DP (n = 3). Cultivos tiveram duração de 9 dias.

Nota-se que os valores obtidos foram crescentes em relação a quantidade de glucose utilizada. O cultivo heterotrófico resultou em maior produção de biomassa, obtendo um rendimento de até 6,5 vezes maior quando comparado ao cultivo mixotrófico, e 4,7 vezes maior quando comparado ao maior rendimento obtido com o cultivo autotrófico (BG11 0,65 g L⁻¹).

Nesse estudo os maiores rendimentos de biomassa, foram obtidos com os cultivos heterotróficos adicionados de glucose nas concentrações de 10 e 5 g L⁻¹, atingindo produções máximas de biomassa de 3,07 e 2,41 g L⁻¹, respectivamente. Os cultivos em condições mixotróficas apresentaram rendimento menor quando comparados ao cultivo heterotrófico nas mesmas concentrações de glucose (5 e 10 g L⁻¹), atingindo produções de biomassa de 1,68 e 1,91 g L⁻¹, respectivamente. Para os cultivos heterotrófico e mixotrófico adicionados de 1 g L⁻¹ de glucose, denominados H1 e M1, respectivamente, os rendimentos de biomassa foram os menores obtidos, com produção de 0,47 e 0,73 g L⁻¹. Todos os cultivos heterotróficos e mixotróficos, exceto o cultivo H1, obtiveram valores superiores na produção de biomassa seca em comparação aos rendimentos de biomassa obtidos nos cultivos autotróficos (WC 0,48 g L⁻¹, CHU 0,56 g L⁻¹ e BG11 0,65 g L⁻¹).

Valores semelhantes aos obtidos com os cultivos heterotrófico com 10 g L⁻¹ de glucose, foram reportados por Ren et al. (2013), ao testar diferentes fontes de carbono em condições heterotróficas com a microalga *Scenedesmus* sp., obtendo a melhor produção de biomassa (3,46 g L⁻¹) com glucose a 10 g L⁻¹. Hakalin (2014)

estudou o cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. em condições heterotróficas e mixotróficas, tendo como fonte de carbono glucose (10 g L^{-1}), e obteve 4 e $5,12 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, respectivamente.

Outras fontes de carbono também já foram testadas na literatura. O estudo realizado por Yang et al. (2014), ao utilizar xilose em condições mixotróficas com a microalga *S. obliquus*, obteve um aumento na produção de biomassa de 2,8 vezes ($2,2 \text{ g L}^{-1}$) quando comparado com o cultivo autotrófico. *Chlorella pyrenoidosa* foi cultivada com sacarose como fonte de carbono e foi obtida uma produção de biomassa de $2,71 \text{ g L}^{-1}$ (WANG; WU; WANG, 2016). A influência de diferentes fontes de carbono como frutose, maltose, glucose, sacarose, dentre outros, foram testadas quanto a produção de biomassa pelas microalgas *Scenedesmus* sp. e *C. zofingiensis* em condições heterotróficas, sendo as maiores produções ($4,12 \text{ g L}^{-1}$ e $10,1 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente) obtidas utilizando glucose como fonte de carbono (LIU et al., 2010; REN et al., 2013).

Embora a fonte de carbono possa encarecer o custo da produção de biomassa microalgal, uma alternativa viável é o uso de fontes de carbono alternativas, provenientes de processos industriais (ZHANG et al., 2013). Nesse contexto, vários estudos têm empregado fontes orgânicas baratas. *Chlorella* sp. em condições heterotróficas produziu $4,46 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, utilizando glicerol como fonte de carbono (KATIYAR et al., 2017). *C. vulgaris*, *Botryococcus braunii* e *Scenedesmus* sp., quando cultivadas em condições mixotróficas utilizando glicerol como fonte de carbono acumularam respectivamente 4,54; 5,42 e $4,62 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca (SAA et al., 2015).

Entre as fontes de carbono alternativas, o melaço de cana vem sendo proposta de forma promissora (JIANG et al., 2009; YAN et al., 2011; GAURAV et al., 2016), uma vez que cerca de 50% de sua composição é constituída por carboidratos (sacarose, glicose, frutose) (NAJAFPOUR; SHAN, 2003). *Spirulina platensis* quando cultivada em condições mixotróficas, utilizando melaço de cana como fonte de carbono alternativa, atingiu uma produção de $2,94 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa (ANDRADE; COSTA, 2007). Resultado semelhante foi obtido com *Scenedesmus* sp. em condições mixotróficas, utilizando melaço de cana, alcançando $3,4 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca (MA et al., 2017).

De modo geral, os cultivos de microalgas são obtidos em sistemas autotróficos em lagoas abertas ou em fotobiorreatores, no entanto as densidades

celulares obtidas são baixas (BRENNAN; OWENDE, 2010; HUANG et al., 2010) muitas vezes limitada pela deficiência de luz ou auto-sombreamento (PEREZ-GARCIA et al., 2011). De acordo com um levantamento bibliográfico realizado por Mohan et al. (2015), sistemas de cultivos heterotróficos são mais adequados para elevadas produções de microalgas quando comparado a cultivos autotróficos, pois permitem acumular de forma significativa mais biomassa em menos tempo e com ausência de luz.

4.2.3 Composição da Biomassa

Os cultivos heterotrófico e mixotróficos da microalga *D. subspicatus* foram comparados quanto a sua composição de carboidratos, proteínas e lipídios na biomassa (Tabela 14). Observa-se que o carboidrato é o componente mais abundante em todas as biomassas, quando comparado aos teores proteínas, sendo que em condições mixotróficas os percentuais de carboidratos foram maiores do que em condições heterotróficas.

TABELA 14 - COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

CULTIVOS	CARBOIDRATOS (%)	PROTEÍNAS (%)	LIPÍDIOS (%)	CINZAS* (%)
H1	19,3 ± 0,8 ^{b-c}	10,2 ± 4,5 ^a	16,3 ± 1,3 ^b	18,0 ± 0,1
H5	18,5 ± 2,1 ^c	7,7 ± 2,4 ^a	26,2 ± 2,6 ^a	9,1 ± 0,1
H10	18,6 ± 0,7 ^c	5,1 ± 2,1 ^a	26,1 ± 3,1 ^a	7,1 ± 0,1
M1	48,1 ± 8,1 ^a	12,0 ± 0,5 ^a	17,4 ± 2,6 ^{a-b}	22,3 ± 0,1
M5	33,3 ± 4,4 ^b	6,2 ± 2,9 ^a	25,3 ± 3,3 ^{a-b}	20,6 ± 0,1
M10	23,5 ± 8,0 ^{b-c}	7,4 ± 2,3 ^a	20,7 ± 2,2 ^{a-b}	20,0 ± 0,1

NOTA: Resultados foram expresso como média ± DP (n = 3), análise estatística foi realizada usando one-way ANOVA seguido por teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). H1, H5, H10: cultivos heterotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente; M1, M5, M10: cultivos mixotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente. * Valores obtidos por análise termogravimétrica. Cultivos tiveram duração de 9 dias.

Em ambos os cultivos foi possível observar que a microalga acumulou mais carboidrato nos meios que tiveram menos glucose disponível. Essa informação é semelhante a obtida por Shamala, Drawert, Leupold (1982) ao observarem que a microalga *Scenedesmus acutus* produziu maiores quantidades de carboidratos, mesmo em concentrações mais baixas de glucose em condições de cultivo mixotrófico. No entanto, resultados diferentes foram descritos por El-Sheekh et al.

(2012), onde conteúdo de carboidratos nas microalgas *C. vulgaris* e *S. obliquus* foi maior com o aumento da fonte de carbono em condições heterotróficas.

Para os teores de proteínas obtidos nos cultivos heterotróficos, suplementado com 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, foi possível obter 10,2; 7,7 e 5,1%, respectivamente. Podemos observar uma diminuição gradual de acordo com aumento da concentração de glucose no meio de cultivo, esses resultados estão de acordo com os reportados por El-Sheekh et al. (2012), no qual observaram que o aumento da fonte de carbono nos cultivos heterotróficos das microalgas *C. vulgaris* e *S. obliquus* gera uma diminuição nos teores de proteínas obtidos. Para os cultivos mixotróficos essa relação direta entre aumento da fonte de carbono com diminuição dos teores de proteínas não foi observada, sendo que os cultivos suplementados com 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, obtiveram teores de proteínas entre 12,0; 6,2 e 7,4%, respectivamente.

A microalga *Chlorella protothecoides* cultivada em condições heterotróficas com adição de glucose e glicina ao meio, apresentou em sua composição 52,6% de proteína e 10,6% de carboidrato (MIAO; WU, 2006). Em outro estudo, também em condições heterotróficas a microalga *Chlorella vulgaris*, foi cultivada em três diferentes fontes de carbono, glucose, glicerol e acetato, apresentou teores que variaram entre 23 – 44% de carboidratos e 30 – 45% de proteína (LIANG; SARKANY; CUI, 2009).

Os teores de lipídios alcançados nos cultivos foram entre 16,3 a 26,2%, assim como para os carboidratos também foi possível observar que a microalga acumulou mais lipídios nos meios que tiveram menos glucose disponível. As microalgas *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. e *Scenedesmus* sp. quando cultivadas em condições mixotróficas na presença de glicerol como fonte de carbono geraram teores de lipídios entre 3,1 – 16,2% (ANDRULEVICIUTE et al., 2014). Xia et al. (2014) ao cultivar *Desmodesmus abundans* em meio BG11 com adição de ureia obteve um teor de lipídios de 20,2%. Mandal e Mallick (2009) ao cultivar *Scenedesmus obliquus* em condições mixotróficas durante 10 dias com adição de 1 g L⁻¹ de glucose obteve 9,5% de lipídios.

Os valores de cinzas, obtidos em cultivos heterotróficos e mixotróficos variaram entre 7,1 – 22,3%. Esses valores foram semelhantes aos encontrados nos cultivos autotróficos (entre 7,5 – 23,6%). Observa-se que os cultivos adicionados de 1 g L⁻¹ de glucose resultaram em maiores percentuais de cinzas. O inverso

aconteceu com a suplementação de 10 g L⁻¹, onde obteve-se os menores percentuais. Todos esses resultados em conjunto evidenciam que a adição de glucose pode influenciar diretamente na composição química da biomassa microalgal.

4.2.4 Análise Termogravimétrica da Biomassa

As biomassas brutas da microalga *D. subspicatus*, cultivadas em meio CHU, em condições heterotróficas e mixotróficas, foram avaliadas quanto as suas características de degradação térmica. As análises termogravimétricas foram realizadas nas mesmas condições que para as biomassas microalgais brutas do cultivo autotrófico, descritas no item 4.1.5 (atmosfera de nitrogênio, 25 – 800 °C, 10 °C min⁻¹).

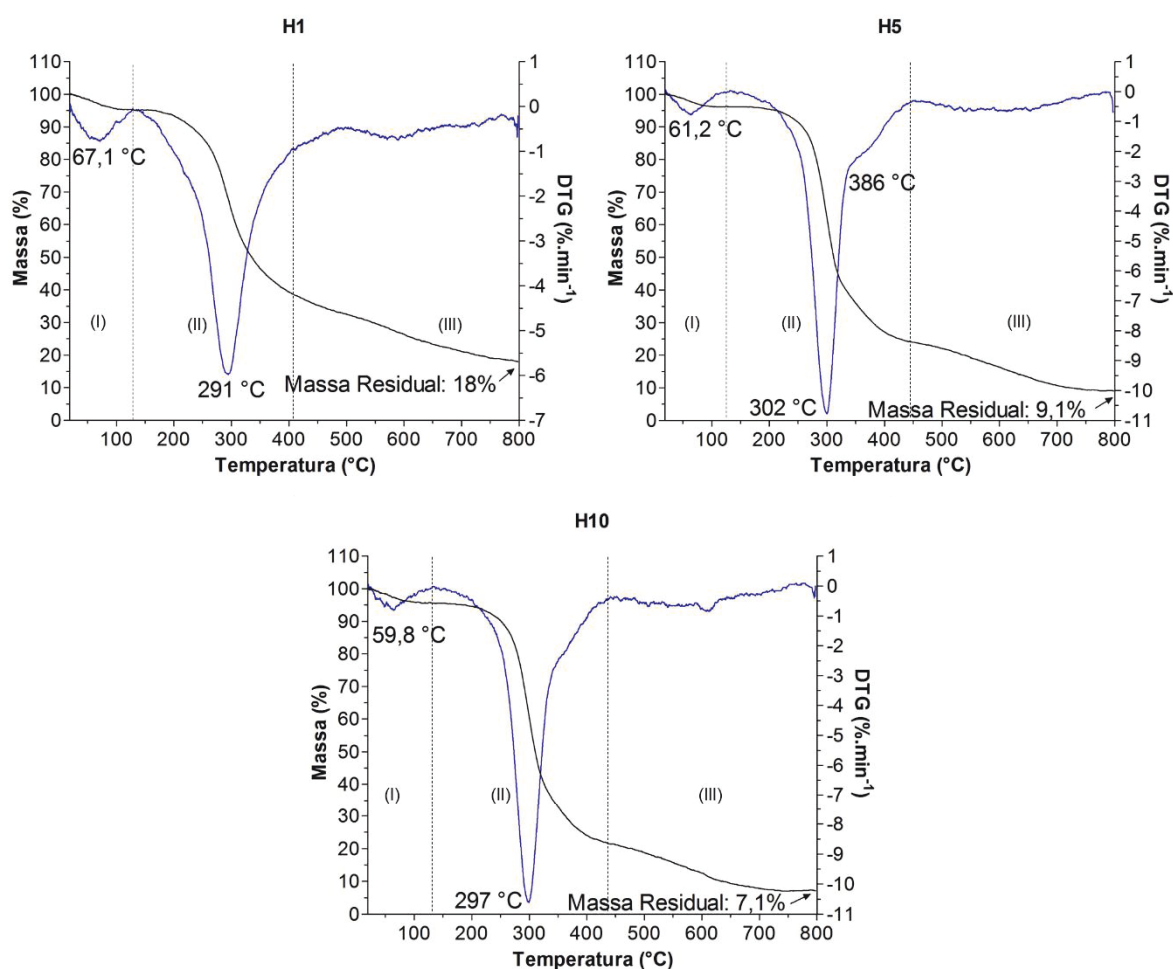
A Figura 51 mostra o perfil de degradação térmica da biomassa da microalga *D. subspicatus*, cultivada em condições heterotróficas em meio CHU suplementado com 1, 5 e 10 g L⁻¹ (frações H1, H5 e H10). De acordo com as curvas termogravimétricas e suas derivadas correspondentes é possível observar que as amostras apresentaram comportamentos semelhantes no que diz respeito à perda de massa, revelando três etapas distintas de degradação. A degradação da primeira etapa (I) ocorreu entre 20 – 128 °C (H1), 20 – 120 °C (H5) e 20 – 122 °C (H10) com pequenas perdas de massa de 5,0; 3,9 e 4,8%, respectivamente, correspondes à eliminação de água.

A segunda etapa (II) de degradação ocorreu entre 132 – 460 °C (H1), 127 – 451 °C (H5) e 127 – 463 °C (H10), e corresponde as maiores perdas de massa, com 60,8; 72,2 e 75,2%, respectivamente. Para as amostras H1 e H10 observa-se um único evento principal em 291 e 297 °C, respectivamente. A amostra H5 apresenta um evento principal em 302 °C contendo um ombro em temperatura mais elevada de 386 °C. A composição química dessas biomassas mostra a presença de proteínas (H1: 12,0%; H5: 6,2%; H10: 7,4%), carboidratos (H1: 19,3%; H5: 18,5%; H10: 18,6%) e lipídios (H1: 15,4%; H5: 26,2%; H10: 26,1%),. Peng, Wu, Tu (2001) analisaram o comportamento pirolítico da microalga *Chlorella protothecoides* cultivada heterotroficamente. O resultado obtido para a biomassa bruta indicou dois eventos de degradação no segundo estágio, com temperaturas máximas em 300 e 410 °C. Dessa forma, sugere-se que a primeira zona de degradação inclui a

decomposição de polissacarídeos solúveis e proteínas, enquanto a segunda zona inclui polissacarídeos insolúveis e lipídios (WANG et al., 2007; BOTHARA; SINGH, 2012; HEMPEL; PETRICK; BEHRENDT, 2012; KASSIM et al., 2014).

A terceira etapa (III) de degradação ocorreu entre aproximadamente 449 °C e a temperatura final de 800 °C. Ao final da terceira fase, podemos observar o material não degradado ao decorrer do experimento, que corresponde a 18,0% (H1), 9,1% (H5) e 7,1% (H10).

FIGURA 51 - TERMOGRAMAS DAS BIOMASSAS MICROALGAIS BRUTAS CULTIVADAS HETEROTROFICAMENTE (TG —; DTG —)



NOTA: H1, H5, H10: cultivos heterotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente.

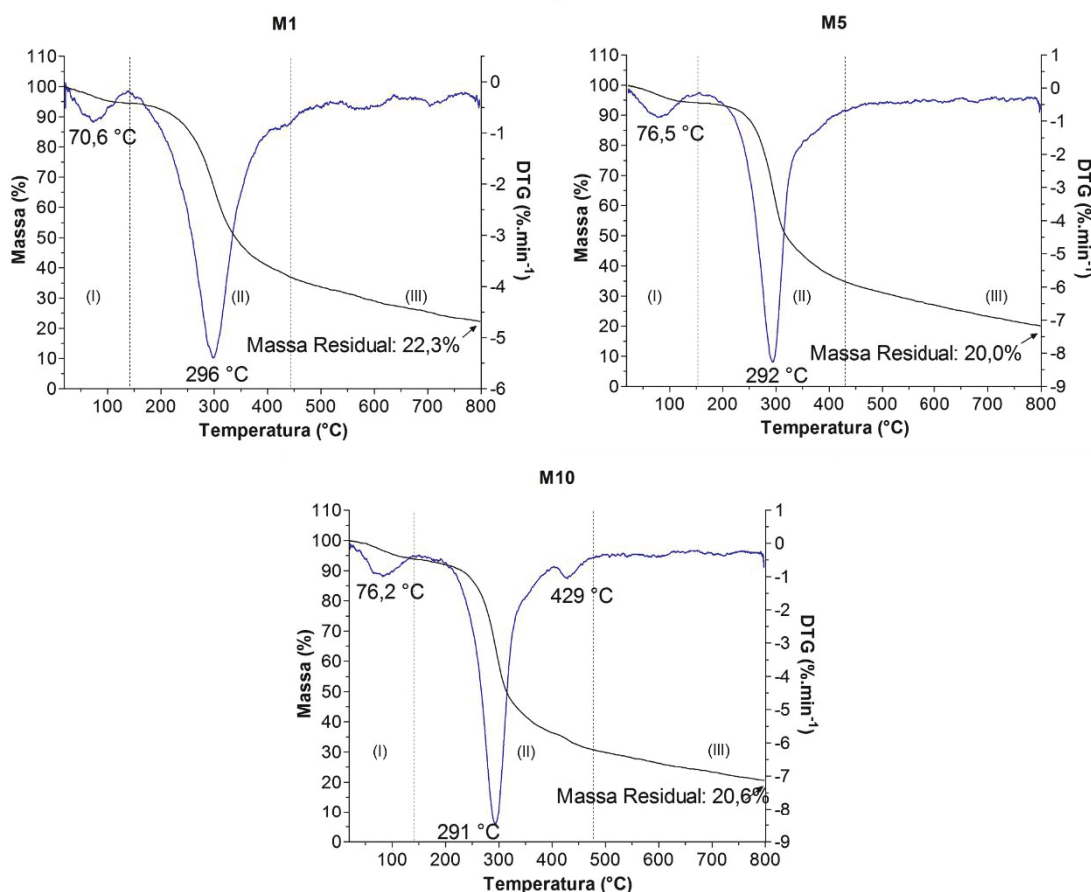
A Figura 52 mostra o perfil de degradação térmica da biomassa da microalga *D. subspicatus*, cultivada em condições mixotróficas em meio CHU suplementado com 1, 5 e 10 g L⁻¹ (frações M1, M5 e M10).

Suas curvas termogravimétricas apresentaram comportamentos semelhantes no que diz respeito à perda de massa, revelando três etapas distintas

de degradação. A degradação da primeira etapa (I) ocorreu entre 23,7 – 139 °C (M1), 22,5 – 152 °C (M5) e 22,2 – 151 °C (M10) com perdas de massa de 5,4; 5,9 e 6,4%, respectivamente, correspondes à eliminação de água.

A segunda etapa (II) de degradação ocorreu entre 140 – 434 °C (M1), 154 – 404 °C (M5) e 157 – 465 °C (M10), e corresponde as maiores perdas de massa, com 57,1; 57,4 e 61,9%, respectivamente. As biomassas são compostas de proteínas (M1: 10,2%; M5: 7,7%; M10: 5,1%), carboidratos (M1: 48,1%; M5: 33,3%; M10: 23,5%) e lipídios (M1: 17,4%; M5: 25,3%; M10: 20,7%)

FIGURA 52 - TERMOGRAMAS DAS BIOMASSAS MICROALGAIS BRUTAS CULTIVADAS MIXOTROFICAMENTE (TG —; DTG —)



NOTA: M1, M5, M10: cultivos mixotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente.

Para as amostras M1 e M5 observa-se um evento principal em 296 e 292 °C, correspondente a degradação de carboidratos e proteínas solúveis. Esses resultados assemelham-se aos obtidos para a biomassa microalgal cultivada autotroficamente em meio CHU, que contém teores de carboidratos (31,9%) superiores aos teores de proteínas (13,4%) (item 4.1.2) e seus termogramas

demonstraram um evento principal no segundo estágio com temperatura máxima de 291 °C (item 4.1.5). Razzak et al. (2015) observou temperaturas máximas de degradação entre 290 e 300 °C em biomassas de *Nannochloropsis oculata* cultivadas mixotroficamente.

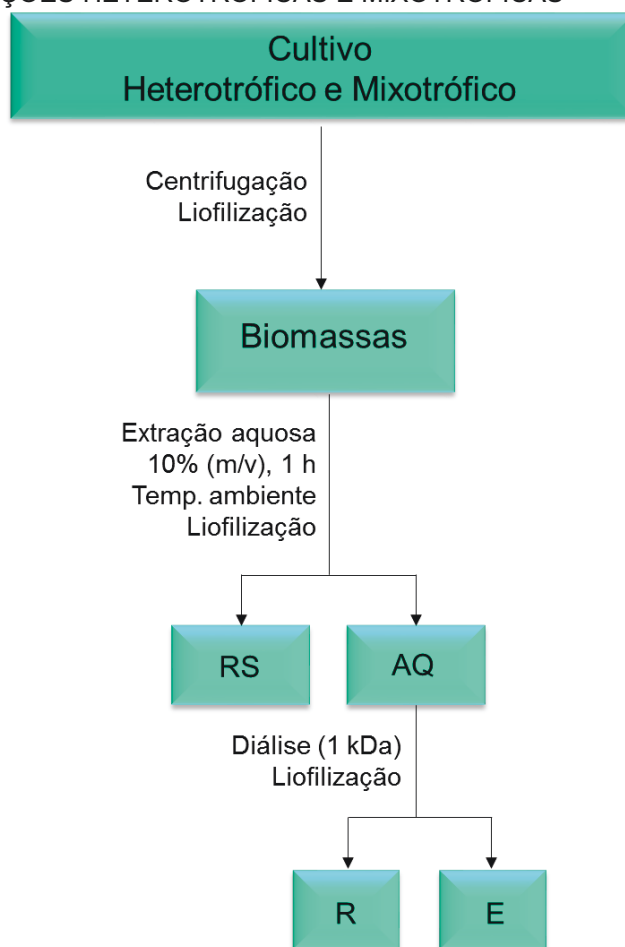
Diferentemente, o termograma da amostra M10, além do evento principal com temperatura máxima de degradação em 291 °C, apresenta um evento pequeno em temperatura máxima de 429 °C. Análises de degradação térmica de lipídeos extraídos de *D. subispcatus* cultivada autotroficamente em meio CHU mostraram no segundo estágio a presença de três eventos principais, em 253, 379 e 431 °C (dados não apresentados). Esses resultados estão em acordo com Sanches-Silva et al. (2012) que analisaram biomassa de *Nannochloropsis gaditana* e observaram em seus termogramas a presença de um ombro em 411 °C associado à degradação de lipídios brutos. Kebelmann et al. (2013) ao analisarem extratos lipídicos de *Chlamydomonas reinhardtii* e *C. vulgaris* identificaram temperaturas de degradação máximas de 300 e 410 °C, correspondentes a degradação de cadeias de hidrocarbonetos de ácidos graxos constituintes de lipídios. Dessa forma, infere-se que o evento em 429 °C corresponde a degradação térmica de lipídios.

A terceira etapa (III) de degradação ocorreu entre aproximadamente 402 °C e a temperatura final de 800 °C. Os teores de cinzas obtidos foram 22,3% (M1), 20,6% (M5) e 20,0% (M10).

4.2.5 Extração de Compostos de Baixa Massa Molecular da Biomassa Microalgal

Assim como para os cultivos autotróficos (item 4.1.6), após o cultivo das microalgas, em condições heterotróficas e mixotróficas, e obtenção das respectivas biomassas secas, foram realizadas extrações aquosas seguidas de diálise (em membrana com *cut-off* de 1 kDa) objetivando isolar compostos de baixa massa molecular (Figura 53).

FIGURA 53 - FLUXOGRAMA GERAL DE EXTRAÇÃO DA BIOMASSA DE *Desmodemus subspicatus* EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS



NOTA: RS: Biomassa residual da extração aquosa; AQ: Extrato Aquoso; R: Fração retida da diálise em membrana de 1 kDa; E: Fração eluída da diálise em membrana de 1 kDa.

O rendimento desses extratos aquosos foi calculado em relação à massa seca inicial da biomassa (% m/m). As frações eluídas (E) obtidas por diálises tiveram seus rendimentos calculados a partir dos extratos aquosos (% m/m) (Tabela 15).

TABELA 15 - RENDIMENTOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA E FRAÇÃO “E” DAS BIOMASSAS CULTIVADAS SOB CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS

FRAÇÕES	AQ ^a	E ^b
H1	14,8	77,3
H5	13,8	82,9
H10	13,3	68,3
M1	14,8	80,7
M5	11,3	67,0
M10	11,6	68,3

NOTA: H1, H5, H10: cultivos heterotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente; M1, M5, M10: cultivos mixotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente. ^aAQ: Rendimentos em relação a biomassa inicial (% m/m); ^bE: Rendimentos em relação ao extrato aquoso (% m/m).

Os rendimentos da extração aquosa em relação a biomassa, variaram pouco entre os diferentes cultivos, com resultados entre 11,6 – 14,8% m/m, resultados estes similares aos encontrados na extração aquosa de cultivos autotróficos, onde obteve-se rendimentos entre 10,3 – 12,6% m/m. O mesmo aconteceu para as frações E, onde obteve-se rendimentos entre 67,0 – 82,9% m/m nos cultivos mixotróficos e heterotróficos, e entre 73 – 75% m/m nos cultivos autotróficos.

4.2.6 Identificação e Quantificação de Fitormônios nos Extratos da Microalga *Desmodesmus subspicatus*

As frações E de baixa massa molar (< 1 kDa) obtidas por diálise, dos cultivos heterotróficos e mixotróficos, foram analisadas por UHPLC-MS objetivando identificar e quantificar a presença de fitormônios. Para isso, diferentes padrões de fitormônios foram utilizados, e as amostras foram comparadas de acordo com seus íons precursores e tempos de retenção descritos na Tabela 11.

Foi possível identificar *trans*-zeatina em todas as frações E dos cultivos heterotróficos (EH1, EH5 e EH10) e mixotróficos (EM1, EM5 e EM10), com teores variando entre 45,7 – 108,0 pg μL^{-1} . No cultivo heterotrófico a fração EH5 apresentou a maior concentração de *trans*-zeatina, 108,0 pg μL^{-1} , sendo esta 57,7 e 40,6% mais concentrada que as frações EH10 e EH1, que contém 45,7 e 64,1 pg μL^{-1} de *trans*-zeatina, respectivamente. Para os cultivos mixotróficos, a fração EM1 foi a que apresentou maior concentração de *trans*-zeatina, 71,1 pg μL^{-1} , sendo esta 6,1 e 22,5% mais concentrada que as frações EM5 e EM10, com 55,1 e 77,7 pg μL^{-1} de *trans*-zeatina. A Tabela 16 resume os resultados obtidos.

TABELA 16 – IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *trans*-ZEATINA NAS FRAÇÕES “E” DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO

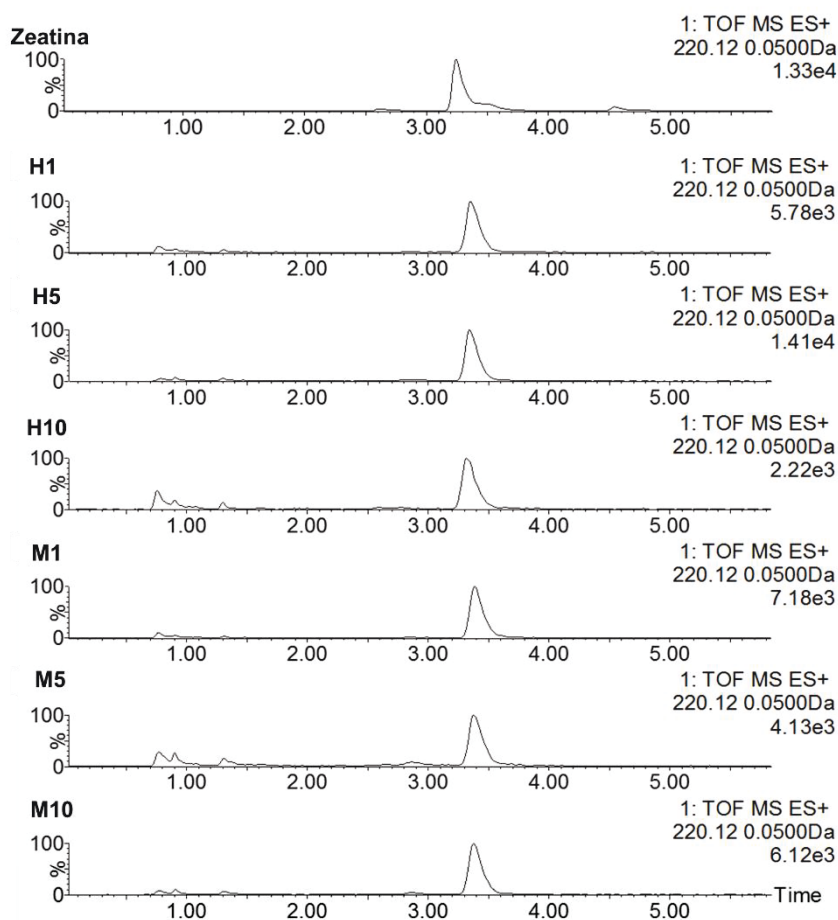
AMOSTRA		<i>trans</i> - ZEATINA (pg μL^{-1})
Heterotrófico	EH1	64,1
	EH5	108,0
	EH10	45,7
Mixotrófico	EM1	71,1
	EM5	55,1
	EM10	66,7

NOTA: EH1, EH5, EH10: frações eluídas da diálise em membrana de 1 kDa obtidas a partir de biomassas cultivadas heterotroficamente em meio CHU adicionado de 1, 5 e 10 g L^{-1} de glucose,

respectivamente; EM1, EM5, EM10: frações eluídas da diálise em membrana de 1 kDa obtidas a partir de biomassas cultivadas mixotrophicamente em meio CHU adicionado de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente.

Na Figura 54 é possível observar o cromatograma do padrão de *trans*-zeatina e das frações E obtidas em cultivos heterotróficos e mixotróficos.

FIGURA 54 - CROMATOGRAMAS DA *trans*-ZEATINA E FRAÇÕES “E” DOS CULTIVOS HETEROTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS

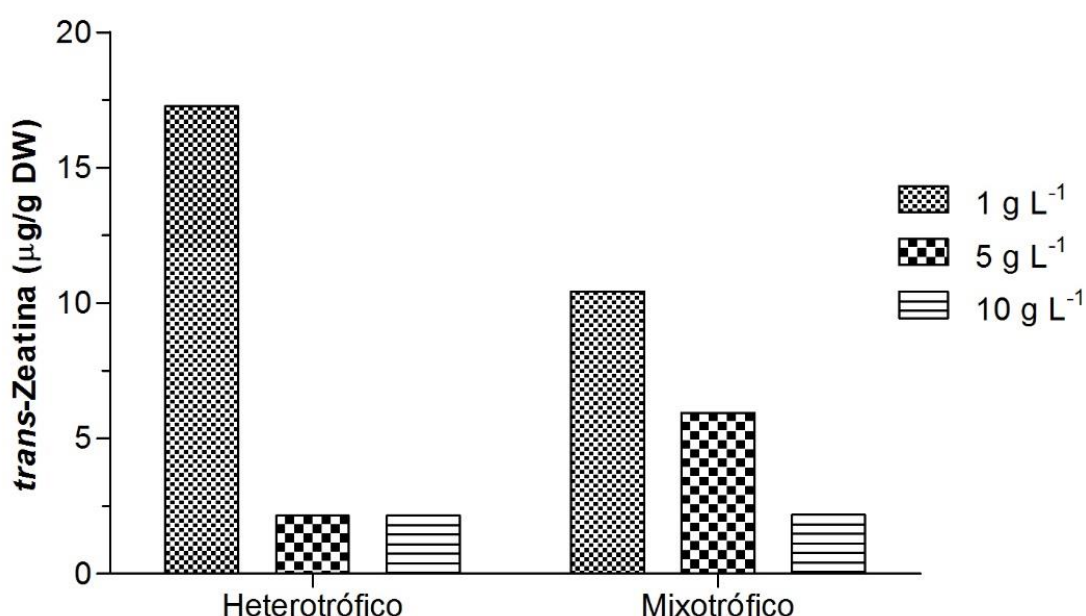


NOTA: H1, H5, H10: cultivos heterotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente; M1, M5, M10: cultivos mixotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar uma relação direta da quantidade de produção de *trans*-zeatina com as quantidades de fonte de carbono (glucose) adicionadas aos cultivos mixotróficos. Entretanto, essa mesma relação direta não foi observada no cultivo heterotrófico. Cabe ressaltar que as menores concentrações de glucose, para ambos os sistemas de cultivo, resultaram em aumento da produção de *trans*-zeatina (Figura 55).

Esses valores quando comparados com a produção de *trans*-zeatina obtida em condições autotróficas com o meio CHU e BG11, no qual apresentaram rendimentos de 9,97 e 9,50 μg de *trans*-zeatina/g DW respectivamente, em condições heterotróficas foi possível obter um aumento de 65,4% de *trans*-zeatina/g DW, com o H1 (1 g L⁻¹ de glucose). Em condições mixotróficas esse aumento é de 42,7% comparado com o cultivo M1 (1 g L⁻¹ de glucose).

FIGURA 55 – ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE *trans*-ZEATINA NA BIOMASSA SECA DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM CONDIÇÕES HETEROTRÓFICAS E MIXOTRÓFICAS



Stirk et al. (2011) observou a variação da concentração de citocininas (zeatina e isopenteniladenina) na microalga *Chlorella* sp. em relação ao fotoperíodo e tempo de cultivo em diferentes intervalos de horas (3, 24 e 48 h). Alguns cultivos, após 24 h, foram mantidos em regime escuro contínuo. O estudo verificou que a concentração das citocininas aumentava em relação ao aumento da taxa de crescimento e não variava nos cultivos em que não havia exposição a luz, concluindo que há uma relação entre intensidade luminosa, o ciclo celular e a concentração de citocininas. Outro estudo com a microalga *Chlorella minutissima*, realizado pelo mesmo grupo, avaliou o efeito do fotoperíodo (14:10 claro: escuro), regime escuro contínuo, e condições heterotróficas com adição de 5 g L⁻¹ de glucose por um período de 48 horas (STIRK et al., 2014). Os cultivos com fotoperíodo foram os que produziram maiores quantidades de citocininas. As culturas em condições

heterotróficas foram as que apresentaram maiores teores de AIA. De acordo com os autores, foi observado que tanto a intensidade luminosa como a taxa de crescimento celular influenciam nas concentrações de fitormônios. No presente estudo não foi possível observar a presença de AIA nos cultivos heterotrófico, mas cabe ressaltar que os processos de extração dos estudos relatados na literatura são realizados com solventes orgânicos, o que pode influenciar diretamente nos resultados obtidos.

4.2.7 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das Frações “E” dos cultivos heterotróficos e mixotróficos

Assim como para as frações “E” derivadas dos cultivos autotróficos, as frações “E” derivadas dos cultivos heterotróficos (EH1, EH5 e EH10) e mixotróficos (M1, M5 e M10) foram analisadas por RMN. A região anomérica dos espectros de HSQC dessas frações, é apresentado na Figura 56.

Nas frações EH1 e EH5 é possível observar correlações em 4,42/103,4 e 4,98/98,4 referentes ao H1/C1 de unidades de 6- β -D-Galp-(1 \rightarrow e α -D-Galp-(1 \rightarrow pertencentes ao glicosídeo Digalactosil-glicerol (SASSAKI et al., 1999; ARNOLD et al., 2015).

Observa-se nas frações EH1, EH5 e EH10 correlações em 4,89/93,8; 4,89/93,6; 4,89/93,5 ppm com constante de acoplamento ($J_{1,2}$) de 0,8 Hz, respectivamente, correlacionadas ao monossacarídeo β -D-Manp, em função de seus valores típicos de acoplamento axial-equatorial (BUBB, 2003). As correlações em 5,18/94,0; 5,18/93,8 e 5,18/93,9 ppm com constante de acoplamento ($J_{1,2}$) de 1,5 Hz, visualizadas nas mesmas frações, foram atribuídas ao monossacarídeo α -D-Manp (BOCK; PEDERSEN, 1983). Na fração EH1, é possível ainda observar correlações intensas em 5,23/92,1 e 4,64/95,9 ppm ($J_{1,2}$ = 3,9 e 7,9 Hz, respectivamente), atribuídas a estruturas redutoras de α -D-Glcp e β -D-Glcp (BOCK; PEDERSEN, 1983).

A presença de correlações, nas frações H5 e H10, atribuídas à unidades redutoras de α/β -D-Glcp (\cong 5,23/92,0 e 4,64/95,9 ppm), aos terminais não redutores de unidades D-Glcp (\cong 5,33/99,3 ppm) e à unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4)-ligadas (5,37/99,7 ppm), sugerem que estas frações apresentam malto-oligossacarídeos em sua composição (HEYRAUD et al., 1979; BOCK; PEDERSEN, 1983; RIZZI, 2010;

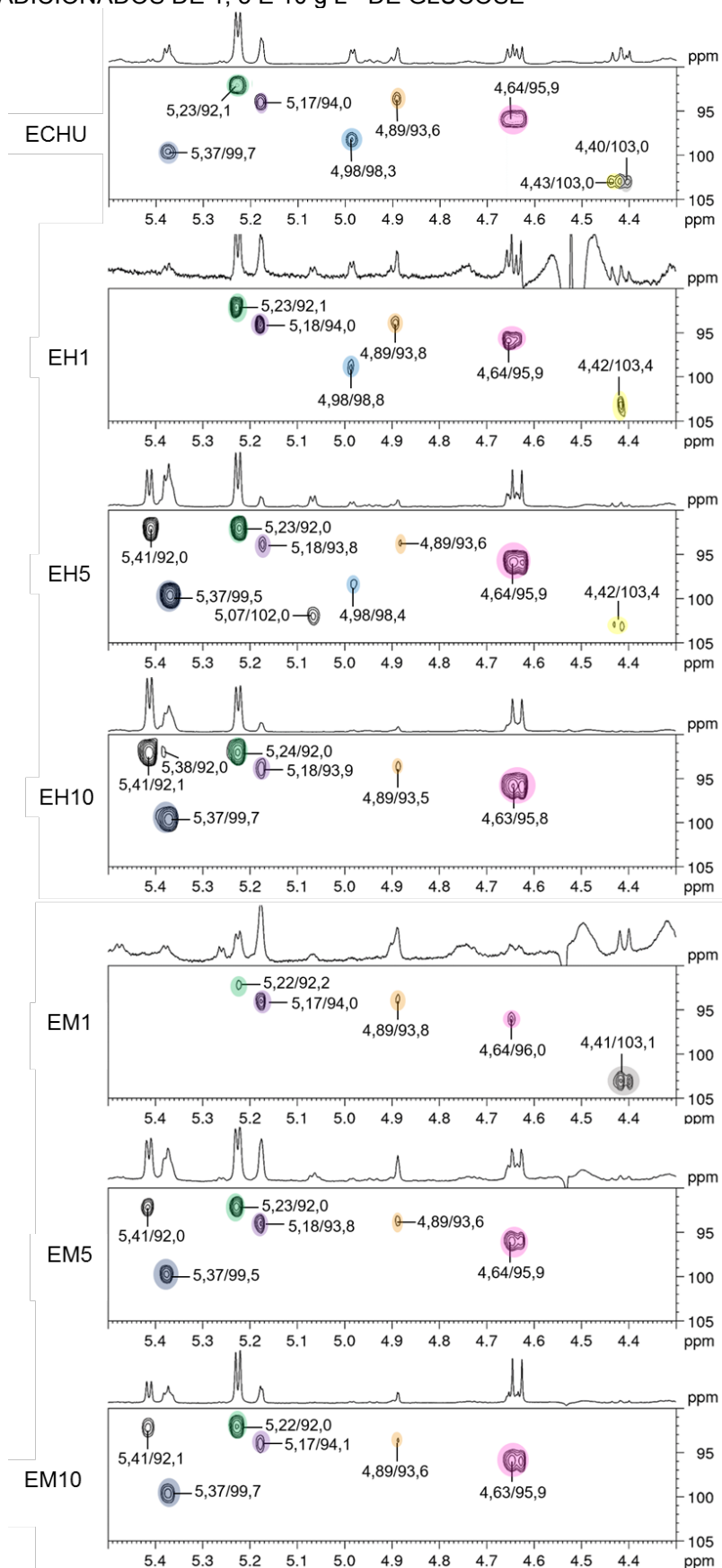
CHENG; NEISS, 2012; GOO et al., 2013; JORDAN et al., 2014; KUZ'MINA et al., 2015). Essas moléculas não são visualizadas no espectro de HSQC da fração EH1.

Nas frações M1 é possível observar uma correlação em 4,41/103,1 ppm atribuída a unidades de β -D-Galp-(1 \rightarrow), constituintes do glicosídeo Monogalactosil-glicerol (β -D-Galactopiranosose-(1 \rightarrow 1)-Glicerol) (SASSAKI et al., 1999; RUBERTO; TRINGALI, 2004).

Assim como observado em todas as frações EH, observa-se nas frações EM1, EM5 e EM10 correlações em 4,89/93,6 ppm ($J_{1,2} = 0,8$ Hz) e aproximadamente 5,17/94,0 ppm ($J_{1,2} = 1,6$ Hz), atribuídas aos monossacarídeos β -D-Manp e α -D-Manp, respectivamente (BOCK; PEDERSEN, 1983; BUBB, 2003). Similarmente a fração EH1, na fração EM1 é também possível observar correlações em 5,22/92,2 e 4,64/96,0 ppm, atribuídas aos monossacarídeos α -D-Glcp e β -D-Glcp (BOCK; PEDERSEN, 1983).

Nas frações EM5 e EM10 é possível visualizar, assim como descrito anteriormente para as frações EH5 e EH10, correlações em 5,23/92,0; \cong 4,64/95,9; e \cong 5,37/99,7 ppm, atribuídas à unidades redutoras de α/β -D-Glcp e unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4)-ligadas (5,37/99,7 ppm), indicando a presença de malto-oligossacarídeos em sua composição (HEYRAUD et al., 1979; BOCK; PEDERSEN, 1983; RIZZI, 2010; CHENG; NEISS, 2012; GOO et al., 2013; JORDAN et al., 2014; KUZ'MINA et al., 2015), moléculas estas não visualizadas no espectro de HSQC da fração EM1. As frações H5, H10, M5 e M10, adicionalmente, apresentam uma correlação intensa em aproximadamente 5,41/92,0 ppm com constante $J_{1,2}$ de 3,87 Hz, característica de açúcares redutores em configuração α (BOCK; PEDERSEN, 1983) e não visualizadas nas demais frações.

FIGURA 56 - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO ECHU E DAS FRAÇÕES "E" DERIVADAS DE CULTIVOS HETEROTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS REALIZADOS EM MEIO CHU ADICIONADOS DE 1, 5 E 10 g L⁻¹ DE GLUCOSE



NOTA: Solvente: D₂O; temperatura: 50 °C; padrão interno: acetona (2,224/30,2 ppm).

Em resumo, foi possível identificar a presença de glicosídeos (Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol), malto-oligossacarídeos (α -(1 \rightarrow 4)-Glucoligossacarídeos) e monossacarídeos em frações α e β (D-Glcp e D-Manp). Todos os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos observados na região anomérica das frações e subfrações derivadas são apresentados na Tabela 17.

TABELA 17 - ASSINALAMENTOS DE CARBONO E HIDROGÊNIO PRESENTES FRAÇÕES “E” DERIVADAS DE CULTIVOS HETEROTRÓFICOS E MIXOTRÓFICOS REALIZADOS EM MEIO CHU ADICIONADO DE 1, 5 E 10 g L⁻¹ DE GLUCOSE

UNIDADES	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) H1/C1						
	ECHU	EH1	EH5	EH10	EM1	EM5	EM10
Digalactosil-glicerol							
6- β -D-Galactopiranosse-(1 \rightarrow	4,43/ 103,0	4,42/ 103,4	4,42/ 103,4	-	-	-	-
α -D-Galactopiranosse-(1 \rightarrow	4,98/ 98,3	4,98/ 98,8	4,98/ 98,4	-	-	-	-
Monogalactosil-glicerol							
β -D-Galactopiranosse-(1 \rightarrow	4,40/ 103,0	-	-	-	4,41/ 103,1	-	-
Malto-oligossacarídeos							
4 \rightarrow)- α -D-Glucopiranosse	5,23/ 92,1		5,23/ 92,0	5,24/ 92,0	-	5,23/ 92,0	5,23/ 92,0
4 \rightarrow)- β -D-Glucopiranosse	4,64/ 95,9	--	4,64/ 95,9	4,63/ 95,8	-	4,64/ 95,9	4,63/ 95,9
α -D-Glucopiranosse-(1 \rightarrow	-	-	5,33/ 99,8	5,34/ 99,5	-	-	-
\rightarrow 4)- α -D-Glucopiranosse-(1 \rightarrow	5,37/ 99,7	-	5,37/ 99,5	5,37/ 99,7	-	5,37/ 99,5	5,37/ 99,7
Monossacarídeos							
α -D-Glucopiranosse	5,23/ 92,1	5,23/ 92,1	5,23/ 92,0	5,24/ 92,0	5,22/ 92,2	5,23/ 92,0	5,22/ 92,2
β -D-Glucopiranosse	4,64/ 95,9	4,64/ 95,9	-	-	4,64/ 96,0	-	-
α -D-Manopiranosse	5,17/ 94,0	5,18/ 94,0	5,18/ 93,8	5,18/ 93,9	5,17/ 94,0	5,17/ 93,8	5,17/ 94,1
β -D-Manopiranosse	4,89/ 93,6	4,89/ 93,8	4,89/ 93,6	4,89/ 93,5	4,89/ 93,6	4,89/ 93,6	4,89/ 93,6

NOTA: ECHU: Fração E derivada de cultivo autotrófico. EH1, EH5, EH10: fração E derivada de cultivos heterotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente; EM1, EM5, EM10: fração E derivada de cultivos mixotróficos realizados em meio CHU adicionados de 1, 5 e 10 g L⁻¹ de glucose, respectivamente.

Ao comparar as frações “E” derivadas de cultivos heterotróficos (EH1, EH5 e EH10) às frações “E” derivadas de cultivos mixotróficos (EM1, EM5 e EM10) foi possível observar pequenas semelhanças e diferenças entre os espectros de RMN das frações. As frações EH10, EM5 e EM10 apresentaram as mesmas correlações no espectro de HSCQ, não sendo observado a presença de glicosídeos. As frações

EH1 e EH5 apresentaram sinais característicos de Digalactosil-glicerol, moléculas não presentes nas demais frações. A fração EM1 apresentou, exclusivamente, sinais característicos do glicosídeo Monogalactosil-glicerol. Não foi possível observar sinais de oligossacarídeos nas frações EH1 e EM1.

Ao comparar as frações “E” derivadas de cultivos heterotróficos (EH1, EH5 e EH10) e mixotróficos (EM1, EM5 e EM10) à fração “E” derivada de cultivos autotróficos (ECHU), todas cultivadas em meio CHU, observa-se pequenas diferenças. A fração ECHU, conforme descrito anteriormente no item 4.1.8, apresentou correlações atribuídas aos glicosídeos Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol, malto-oligossacarídeos e monossacarídeos α/β -D-Manp. Nenhuma das frações obtidas em cultivos heterotróficos ou mixotróficos apresentaram simultaneamente os glicosídeos Digalactosil-glicerol e Monogalactosil-glicerol. Adicionalmente, nas frações H1 e M1 foi possível observar a presença de monossacarídeos D-Glc p e a ausência de oligossacarídeos, moléculas estas, presentes em ECHU. As frações H5, H10, M5 e M10 apresentaram a correlação em 5,41/92,0 ppm, característica de açúcares redutores em configuração α e não visualizada na fração ECHU.

Os resultados obtidos sugerem que a alteração no sistema de cultivo resulta em alterações na composição dessas biomassas, assim como observado quando houve alteração nos teores de macro e micronutrientes do meio em sistema autotrófico (item 4.1.8). Com base nos resultados obtidos, é, portanto, possível sugerir que, adicionalmente ao meio de cultivo, o sistema de cultivo escolhido influencia diretamente na produção de compostos pela microalga.

4.3 ANÁLISE PRÉVIA DE VIABILIDADE ECÔNOMICA PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL DE *Desmodesmus subspicatus*

A fim de determinar a viabilidade econômica para obtenção de biomassa microalgal de *Desmodesmus subspicatus*, estimativas de custos de produção foram realizadas considerando apenas a escala laboratorial e principais insumos utilizados, ignorando um escalonamento da produção e custos envolvidos nos processos de recuperação e secagem da biomassa.

Do custo total para produção de biomassa microalgal, 35% está relacionado ao meio de cultivo, sendo que cerca de 20 – 30% deste representa o custo para

recuperação da biomassa. Os demais custos correspondem a processos operacionais, manutenção e energia (GRIMA et al., 2003; DAVIS; ADEN; PIENKOS, 2011). A Tabela 18 contém as estimativas de custos finais dos meios de cultivo WC, CHU e BG11 para produção de 1000 L de cultivo para microalga. As estimativas de custos foram baseadas em reagentes de grau analítico para todos os componentes do meio.

O meio de cultivo CHU apresentou-se mais econômico, quando comparado aos meios de cultivo WC e BG11. O elevado custo do meio de cultura WC (R\$ 272,34/m³) se deve, principalmente, ao tampão TRIS, o qual correspondente a 94% (R\$ 256,50) do custo total do meio. O meio de cultivo BG11 (R\$ 53,52/m³) apresentou um custo 75% maior quando comparado ao meio CHU (R\$ 30,57/m³). Essa diferença no custo é devido ao meio BG11 possuir elevada quantidade de nitrato (fonte de nitrogênio) em sua composição, o qual é correspondente a 82% (R\$ 43,95) do custo total do meio. No meio de cultivo CHU a fonte de fósforo representa 47% (R\$ 15,59) do custo total do meio, seguido da fonte de nitrato que representa 24% (R\$ 7,32).

O custo total do meio de cultivo, em escala industrial pode ser significativamente reduzido, optando-se por processos mais econômicos, como, por exemplo, o uso de fontes alternativas de nitrogênio como a ureia (MATSUDO et al., 2009), que pode custar 3 vezes menos que o nitrato de sódio (DHUP; KANNAN; DHAWAN, 2016).

TABELA 18 - ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA PRODUÇÃO DE 1000 LITROS DE CULTIVO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM MEIO WC, CHU E BG11

(continua)

NUTRIENTES	CUSTO (R\$)		
	WC	CHU	BG11
Ácido cítrico	-	-	0,238
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	0,027	0,313	0,078
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	0,217	-	-
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	-	-	0,640
Citrato férrico de amônia	-	-	2,160
Cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,790	0,538	0,774
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,013	-	-
Cloreto de ferro hexa-hidratado (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,827	-	-
Cloreto de manganês tetra-hidratado (MnCl ₂ .4H ₂ O)	0,034	0,003	0,340
Cloreto de sódio (NaCl)	-	0,275	-
EDTA dissódico di-hidratado (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	0,284	3,260	0,065

			(conclusão)
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4)	0,766	6,600	3,520
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	-	8,995	-
Hidróxido de potássio (KOH)	-	1,643	-
Molibdato de sódio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,002	0,003	0,158
Nitrato de cobalto hexa-hidratado ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)	-	0,014	0,140
Nitrato de sódio ($NaNO_3$)	2,491	7,325	43,950
Silicato de sódio ($Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$)	9,384	-	-
Sulfato de cobre penta-hidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0,000	0,001	0,003
Sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,714	1,448	1,448
Sulfato de zinco hepta-hidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,001	0,003	0,009
Sulfato ferroso hepta-hidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	-	0,148	-
Biotina	0,034	-	-
Cianocobalamina	0,076	-	-
Tiamina	0,176	-	-
Tris	256,50	-	-
CUSTO TOTAL	272,34	30,57	53,52

NOTA: Dados coletados em Abril de 2017.

Outra alternativa viável para redução do custo do meio de cultivo é a reciclagem do meio utilizado, gerando um reaproveitamento dos nutrientes que não foram consumidos no cultivo anterior (KIM et al., 2011; ABDEL-RAOUF; AL-HAMAIKAN; IBRAHEEM, 2012; RWEHUMBIZA; HARRISON; THOMSEN, 2012; WU et al., 2012; FON SING et al., 2014; FAROOQ et al., 2015). A reciclagem do meio pode reduzir em aproximadamente 55% a entrada de nutrientes (YANG et al., 2011), além de contribuir para o não descarte de água residual não tratada (GONZÁLEZ-LÓPEZ et al., 2013).

Em uma produção de escala industrial a utilização de efluentes ricos em nitrogênio e fósforo caracteriza-se como uma forma sustentável para produção de biomassa microalgal à baixo custo (BHATNAGAR et al., 2011). Adicionalmente, permite reduzir os impactos ambientais na produção de gases do efeito estufa, relacionados a exploração de compostos químicos (N, P, K) essenciais para o cultivo de microalgas (SORATANA, LANDIS, 2011). Assim, o cultivo de microalgas poderia contribuir como uma alternativa ao tratamento desses efluentes diminuindo seu impacto ambiental na eutrofização de corpos hídricos (CAI; PARK; LI, 2013; MELO, 2014).

Cheng, Tian, Liu (2013) ao cultivarem a microalga *Desmodesmus* sp. em resíduos de suínos, obtiveram taxas de remoção de nitrogênio total, nitrogênio amoniacal e fósforo total de 87,3, 95 e 93,1%, respectivamente. Melo (2014) cultivou *C. vulgaris* em efluente sintético rico em nitrogênio e fósforo nas formas de nitrato e fosfato, obtendo uma eficiência de remoção de 96,7 e 95,1%, respectivamente.

Considerando as produções microalgais obtidas em cada meio de cultivo (WC: 0,48 g L⁻¹; CHU: 0,56 g L⁻¹; BG11: 0,65 g L⁻¹), para obtenção de 1 kg de biomassa microalgal o meio CHU se mostrou mais viável, com um custo de produção estimado em R\$ 59,16/kg de biomassa microalgal. Para o meio BG11, o custo estimado foi R\$ 82,67/kg de biomassa. Para o meio WC, o custo estimado foi de R\$ 560,00/kg de biomassa, tornando-o inviável economicamente.

Para o cultivo heterotrófico com adição de glucose (10 g L⁻¹), que representaram um aumento de 79% na produção de biomassa microalgal em relação ao cultivo autotrófico, o custo de produção foi estimado em R\$ 108,20/kg de biomassa. Embora a produção de biomassa microalgal seja maior, a adição da glucose como fonte de carbono representa 90% do custo dessa produção, elevando assim a estimativa de custo. As estimativas dos custos de produção para todos os cultivos heterotróficos e mixotróficos (R\$ 82,81 – 173-91/kg de biomassa) são superiores aos encontrados para o mesmo meio quando utilizado cultivo autotrófico (R\$ 59,16/kg de biomassa). Esses dados mostram que a produção de biomassa em escala comercial, devido ao custo da adição de glucose que encarece muito a produção, torna o cultivo heterótrofo e/ou mixotrófico desvantajoso, sendo necessário o emprego de fontes de carbono mais baratas (XIUFENG; XU; WU, 2007; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; BHATNAGAR et al., 2011).

Uma alternativa viável a fonte de carbono orgânica, é o uso de subprodutos agroindustriais, por serem potencialmente disponíveis em larga escala (QUEIROZ et al., 2013), como por exemplo o melaço de cana. O custo de uma tonelada de melaço de cana é de aproximadamente R\$ 780,00 (MFRURAL, 2017), um valor 40 vezes menor do que o custo de glucose comercial. De modo a evidenciar a viabilidade econômica do uso de fontes alternativas de carbono, uma estimativa de custos utilizando melaço de cana como fonte alternativa de carbono foi realizada, utilizando, para isto, o valor da produção da biomassa obtida em cultivo heterotrófico adicionado de 10 g L⁻¹ de glucose. O uso dessa fonte de carbono alternativa reduz o

custo da produção para R\$ 13,42/kg de biomassa microalgal, o que representa uma economia de 87,6%.

Quando estimado o custo para produção do extrato aquoso, extrato este que contém uma concentração maior de fitormônios em relação a biomassa bruta, os valores variaram entre R\$ 429,17 a 3.263,77/kg de extrato, podendo ser reduzida drasticamente a valores de R\$ 115,64, se for considerado uma fonte de carbono alternativa, como por exemplo o melaço de cana (Tabela 19). Esse custo é diretamente influenciado pelo meio de cultivo, podendo resultar em um aumento de até 28 vezes no custo de produção. No entanto, quando considerado o uso do meio de cultivo associado a uma fonte de carbono alternativa, esse custo pode diminuir em até 96,4%.

TABELA 19- ESTIMATIVA DE CUSTO PARA PRODUÇÃO DE 1 Kg DO EXTRATO AQUOSO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

CULTIVO	MEIO	CUSTO (R\$)
Autotrófico	WC	3.263,77
	CHU	429,17
	BG11	549,22
Heterotrófico	H1 (CHU + 1 g L ⁻¹ glucose)	874,62
	H5 (CHU + 5 g L ⁻¹ glucose)	666,32
	H10 (CHU + 10 g L ⁻¹ glucose)	932,34
	HMEL* (CHU + 10 g L ⁻¹ melaço de cana)	115,64
Mixotrófico	M1 (CHU + 1 g L ⁻¹ glucose)	560,15
	M5 (CHU + 5 g L ⁻¹ glucose)	778,47
	M10 (CHU + 10 g L ⁻¹ glucose)	1.306,49

NOTA: *Para estimativa de custos de HMEL considerou-se a produção de biomassa obtida em H10 e a estimativa de custos da adição de 10 g L⁻¹ de melaço de cana.

Dessa forma, é necessário o emprego de resíduos contendo carbono orgânico, por conferir baixo custo, permitindo viabilizar economicamente o cultivo de microalgas para obtenção de extrato aquoso contendo moléculas bioativas como os fitormônios.

5 CONCLUSÕES

Dentre os meios de cultivo avaliados em condições autotróficas para a produção de biomassa da microalga *Desmodesmus subspicatus*, BG11 foi o que apresentou maior produção ($0,65 \text{ g L}^{-1}$).

As células das microalgas cultivadas em diferentes meios de cultivo em condições autotróficas, não apresentaram diferenças significativas em termos de morfologia (tamanho celular, dos espinhos e roseta), conforme análises de microscopia eletrônica de varredura.

Foi possível identificar e quantificar por UHPLC-MS o fitohormônio *trans*-zeatina em todas as frações E, obtidas a partir dos extratos aquosos da microalga produzida em condições autotróficas, com teores variando entre $43,4 - 96,4 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. A fração ECHU (fração derivada de cultivos em meio CHU) foi a que apresentou a maior concentração de *trans*-zeatina ($96,4 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$). Essas frações também apresentaram traços ($< 30 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$) da auxina ácido indol acético.

O cultivo da microalga *D. subspicatus* em condições heterotróficas resultou em maior produção de biomassa ($3,1 \text{ g L}^{-1}$), obtendo um rendimento de até 37,8% maior quando comparado ao cultivo mixotrófico ($1,9 \text{ g L}^{-1}$).

Todas as frações E, obtidas a partir do extrato aquoso da microalga cultivada em condições heterotróficas e mixotróficas, também apresentaram *trans*-zeatina em sua composição, com teores variando entre $45,7 - 108,0 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. Em condições heterotróficas foi possível obter um aumento de 65,4% de *trans*-zeatina/g DW, quando comparados com a maior produção de *trans*-zeatina obtida em condições autotróficas.

Foi possível identificar, através de análises de RMN, nas frações E dos cultivos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos, glicosídeos (6-Sulfoquinovopirranose-(1→1)-Glicerol, α -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→1)-Glicerol; β -D-Galp-(1→1)-Glicerol), oligossacarídeos ($[\alpha$ -D-Glucopirranose-(1→4)- α -D-Glucopirranose] $_n$), e monossacarídeos livres (D-Glcp, D-Manp, e D-Galp).

Em conjunto, os resultados obtidos mostraram que tanto o meio de cultivo quanto o sistema de cultivo utilizado influenciam diretamente na produção de compostos pela microalga.

Foi confirmada atividade bioestimulante vegetal com a fração E obtida a partir do cultivo autotrófico em meio BG11 (EBG) através de bioensaios com

explantes de cenoura, observando proliferação de massa celular (formação de calos).

Também foi confirmada atividade bioestimulante vegetal através dos bioensaios com sementes de tomate, onde a fração ECHU, obtida a partir do cultivo autotrófico em meio CHU, na concentração $1,0 \text{ g L}^{-1}$ proporcionou maior aumento do comprimento dos hipocótilos de tomate.

Atividade bioestimulante vegetal foi observada nos bioensaios com o milho, onde a fração EFBR CHU, obtida a partir do cultivo autotrófico em fotobiorreator com meio CHU, na concentração $2,0 \text{ g L}^{-1}$ proporcionou maior aumento do comprimento das raízes.

Análise prévia de viabilidade econômica, permitiu identificar que meio de cultivo CHU apresenta o menor custo, quando comparado aos meios de cultivo BG11 e WC. Para a produção e obtenção do extrato aquoso da microalga *D. subspicatus* ser economicamente viável é necessária a substituição da fonte de carbono (glucose comercial) para uma fonte alternativa, como por exemplo o melaço de cana, podendo assim reduzir drasticamente os custos de produção relacionados ao meio de cultura.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A microalga cultivada em diferentes sistemas de cultivo demonstrou potencial para aplicação bioestimulante vegetal, no entanto, é necessário realizar uma otimização das condições de cultivos e extração a fim de aumentar a produção dos compostos de interesse. A realização de mais estudos para caracterização química do extrato aquoso microalgal também devem ser levados em consideração assim como, bioensaios com mudas para efetuar análises de medição da área foliar, massa de matéria seca, tolerância a estresse biótico e abiótico, determinação dos teores de compostos fenólicos, aminoácidos e fitormônios presentes nas plantas tratadas com o extrato aquoso da microalga, uma vez que a aplicação desses produtos bioestimulantes tem o potencial de alterar esses compostos em plantas.

REFERÊNCIAS

ABISOLO 2015. Disponível em: <<http://www.abisolo.com.br/noticia/abisolo-apresenta-posicionamento-sobre-o-conceito-de-biofertilizantes>>. Acesso em: 12 jun 2017.

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HAMAIAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–275, 2012.

ABDELHEDI, O. et al. Sulfated polysaccharides from common smooth hound: Extraction and assessment of anti-ACE, antioxidant and antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 605–614, 2016.

ABREU, A. P. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–66, 2012.

AGRONEWS, 2016. Disponível em: <[Disponihhttp://news.agropages.com/News/NewsDetail---19117.htm](http://news.agropages.com/News/NewsDetail---19117.htm)>. Acesso em: 19 jun. 2017.

AKHTAR, N. et al. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J. (Eds.). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 6**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 93–131.

ALGAEBASE. Disponível em: <<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=90759>>. Acesso em: 29 mar. 2017a.

ALGAEBASE. Disponível em: <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=42443>. Acesso em: 17 jun. 2017b.

ALGAENERGY. Disponível em: <<http://www.algaenergy.es/en/sectors-products/agriculture-agrialgae/>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

ALLGROW. Disponível em: <http://www.allgrow.net/how_it_works.html>. Acesso em: 16 mar. 2017.

AMARAL, A. F. D. C. **Comportamento in vitro de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com níveis de potássio**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

AN, S. S.; FRIEDL, T.; HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence

comparison. **Plant Biology**, v. 1, p. 418–428, 1999.

ANDA. Associação Nacional para Difusão de Adubos. Disponível em: <<http://anda.org.br>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1, p. 130–134, 2007.

ANDRULEVICIUTE, V. et al. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 83–90, 2014.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: Pharmabooks, 2005.

ARAD, S.; ONTMAN, O. L. Red microalgal cell-wall polysaccharides: Biotechnological aspects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 358–364, 2010.

ARNOLD, A. A. et al. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ¹³C solid-state NMR. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 1, p. 369–377, 2015.

ARROYO, T. H.; WEI, W.; HU, B. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 1978–1995, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12648**: Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com algas (Chlorophyceae) Rio de Janeiro, 2011.

BAICHA, Z. et al. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016.

BAJGUZ, A. Brassinosteroid enhanced the level of abscisic acid in *Chlorella vulgaris* subjected to short-term heat stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 8, p. 882–886, 2009a.

_____. Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 17, p. 1946–1949, 2009b.

BARDIVIESSO, D. M. et al. Aplicação foliar de extrato de alga na cultura da batata. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. S1170–S1177, 2011.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. 2. ed. London: CRC press, 2014.

BATISTA, A. P. et al. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 164–173, 2013.

BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39–48, 2015.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.

BHARDWAJ, D. et al. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility , plant tolerance and crop productivity. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014.

BHATNAGAR, A. et al. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3425–3431, 2011.

BICUDO, C. S. D. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2006.

BIORIZON. Disponível em: <
http://www.biorizon.es/productos_biorizon/biopotenciadores/hidrolizado/algafert/>.
Acesso em: 23 jun. 2017.

BIOSTIMULANTS COALITION 2017. What are biostimulants? Disponível em:
<<http://www.biostimulantcoalition.org/about/>>. Acesso em: 22 maio 2017.

BOCK, K.; PEDERSEN, C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 27–66, 1983.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013.

BOTHARA, S. B.; SINGH, S. Thermal studies on natural polysaccharide. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S1031–S1035, 2012.

BOUGARAN, G.; BERNARD, O.; SCIANDRA, A. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. **Journal of Theoretical Biology**, v. 265, n. 3, p. 443–454, 2010.

BRASIL. Decreto-lei nº 8.059, de 26 de julho de 2013. Disponível em: <
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2013/decreto/D8059.htm>.

Acesso em: 07 jun. 2017.

_____. Decreto-lei nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Portal da legislação, Brasília, DF, 14 jan. 2004. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 08 jun. 2017.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 145, n. 1, p. 79–99, 1991.

BROWN, M. R. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151, p. 315–331, 1997.

BROWN, M. R.; FARMER, C. L. Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 1, p. 61–65, 1994.

BUBB, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A: Bridging Education and Research**, v. 19, n. 1, p. 1–19, 2003.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, 2013.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, n. 1–2, p. 3–41, 2014.

CANELLAS, L. P. et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 15–27, 2015.

CARBALLO-CÁRDENAS, E. C. et al. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 139–147, 2003.

CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 6, p. 1490–1506, 2006.

CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C. **Extratos de algas e suas aplicações na agricultura**. Piracicaba: ESALQ, 2014.

CASTRO, P. R. C. **Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical**. Piracicaba: ESALQ, 2006. v. 32

CATO, S. C. **Ação de bioestimulante nas culturas do amendoimzeiro, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberelinas**. 74 f. Tese (Doutorado em Agromonia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial poly-unsaturated fatty acid production. **Review**, v. 87, n. 87, p. 1–14, 1999.

CHAICHALERM, S. et al. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. **Applied Energy**, v. 89, n. 1, p. 296–302, 2012.

CHANDRA, T. S. et al. Growth and biochemical characteristics of an indigenous freshwater microalga, *Scenedesmus obtusus*, cultivated in an airlift photobioreactor: effect of reactor hydrodynamics, light intensity, and photoperiod. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1057–1068, 2017.

CHEN, C. et al. Phototrophic hydrogen production in photobioreactors coupled with solar-energy-excited optical fibers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 23, p. 6886–6895, 2008.

CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.

CHEN, C.-Y. et al. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307–312, 2013.

CHEN, C.-Y. et al. Enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using innovative photobioreactors with optimal light source arrangements. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 407–413, 2015a.

CHEN, C.-Y. et al. Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 500–505, 2016a.

CHEN, T. et al. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2260–2265, 2006.

CHEN, W. et al. Effective biological DeNO_x of industrial flue gas by the mixotrophic cultivation of an oil-producing green alga *Chlorella* sp. C2. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 1620–1627, 2016b.

CHEN, W. H. et al. Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels:

A review. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 314–327, 2015b.

CHEN, Y. H. et al. Agricultural pollution and regulation: How to subsidize agriculture? **Journal of Cleaner Production**, v. 164, p. 258–264, 2017.

CHENG, H. N.; NEISS, T. G. Solution NMR spectroscopy of food polysaccharides. **Polymer Reviews**, v. 52, n. 2, p. 81–114, 2012.

CHENG, H.; TIAN, G.; LIU, J. Enhancement of biomass productivity and nutrients removal from pretreated piggery wastewater by mixotrophic cultivation of *Desmodesmus* sp. CHX1. **Desalination and Water Treatment**, v. 51, n. 37–39, p. 7004–7011, 2013.

CHENG, Y. et al. Alga-based biodiesel production and optimization using sugar cane as the feedstock. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4166–4173, 2009.

CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2017.

CHIU, S.-Y. et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 833–838, 2009.

CHODAT, R. *Scenedesmus* : Etude de génétique, de systématique expérimentale et d'hydrobiologie. **Schweizerischel Zeitschrift fur Hydrologie**, v. 3, p. 71–258, 1926.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 2004.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 461–465, 2004.

CHOJNSCKA, K.; CHOJNACKI, A.; GÓRECKA, H. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. **Chemosphere**, v. 59, p. 75–84, 2005.

COGNE, G.; CORNET, J. F.; GROS, J. B. Design, operation, and modeling of a membrane photobioreactor to study the growth of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* in space conditions. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 741–750, 2005.

COLLA, G. et al. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 28–38, 2015.

COLOMBA, E. L. et al. The effect of genotype and culture medium on somatic embryogenesis and plant regeneration from mature embryos of fourteen apomictic cultivars of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). **Grass and Forage Science**, v. 61, n. 1, p. 2–8, 2006.

CONTI, R. et al. Photobioreactor cultivation and catalytic pyrolysis of the microalga *Desmodesmus communis* (Chlorophyceae) for hydrocarbons production by HZSM-5 zeolite cracking. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 148–155, 2016.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 371–393, 2011.

DAS, P. et al. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3883–3887, 2011.

DAVIS, R.; ADEN, A.; PIENKOS, P. T. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3524–3531, 2011.

DEL RÍO, E. et al. Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains, *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Algal Research**, v. 23, p. 37–42, 2017.

DELATTRE, C. et al. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1159–1179, 2016.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738–2749, 2010.

DHUP, S.; KANNAN, D. C.; DHAWAN, V. Understanding urea assimilation and its effect on lipid production and fatty acid composition of *Scenedesmus* sp. **SOJ Biochemistry**, v. 2, p. 1–7, 2016.

DRAGONE, G. et al. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUONG, V. T. et al. High protein- and high lipid-producing microalgae from Northern Australia as potential feedstock for animal feed and biodiesel. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 53, 2015.

DURMAZ, Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. **Aquaculture**, v. 272, p. 717–722, 2007.

EBIC - European Biostimulants Industry Council. Towards an Optimal Regulatory Framework for Biostimulants, 2015. Disponível em: <<http://www.biostimulants.eu/wp-content/uploads/2015/07/EBIC-PP-Optimal-Regulatory-Framework-Biostimulants-v4-270715.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2017.

EGENER, T.; HUREK, T.; HUREK, B. R. Endophytic expression of nif genes of azoarcus sp. strain BH72 in rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, p. 813–819, 1999.

EL-SHEEKH, M.; HAMOUDA, R. A.; NIZAM, A. A. Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 82, p. 67–72, 2013.

EL-SHEEKH, M. M. et al. Mixotrophic and heterotrophic growth of some microalgae using extract of fungal-treated wheat bran. **International Journal Of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 12, 2012.

ELARROUSSI, H. et al. Microalgae polysaccharides a promising plant growth biostimulant. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 7, n. 4, p. 55–63, 2016.

EL SEMARY, N. A. The polyphasic description of a *Desmodesmus* spp. isolate with the potential of bioactive compounds production. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 15, n. 2, p. 231–238, 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/hortalias/busca-de-noticias/noticia/14218786/bioestimulantes-e-producao-de-hortalias>>. Acesso em: 22 maio 2017.

EPA - Environmental Protection Agency. Update on US Greenhouse Gas Reporting Program. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/201702/documents/ottinger_presentation_2017_workshop.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2017.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1525–1536, 2008.

ESSERTI, S. et al. Media derived from brown seaweeds *Cystoseira myriophylloides* and *Fucus spiralis* for in vitro plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 2, p. 437–446, 2017.

FAROOQ, W. et al. Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel

application. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 73–81, 2015.

FENG, P. et al. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10577–10584, 2011.

FERNANDES, T. et al. Marine microalgae monosaccharide fluctuations as a stress response to nutrients inputs. **Algal Research**, v. 24, n. Part A, p. 340–346, 2017.

FERREIRA, P. V. **Estatística experimental aplicada à agronomia**. Maceió: EDUFAL, 1991.

FERRINI, F.; NICESE, F. P. Response of english OAK (*Quercus robur* L.) trees to bioestimulants application in the urban environment trees to environment. **Journal of Arboriculture**, v. 28, n. 2, p. 70–75, 2002.

FIGUEROA, F. R. Q. et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 3, p. 285–301, 2006.

FIGUEROSA, F. L. et al. Effects of high irradiance and temperature on photosynthesis and photoinhibition in *Nannochloropsis gaditana* Lubián (Eustigmatophyceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 6–15, 1997.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, p. 89–95, 2006.

FLYNN, H. C.; SMITH, P. **Greenhouse gas budgets of crop production – current and likely future trends**. 1. ed. Paris: International Fertilizer Industry Association, 2010.

FON SING, S. et al. Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: A novel protocol for commercial microalgal biomass production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 47–54, 2014.

FUJIMURA, T. Carrot somatic embryogenesis. A dream come true? **Plant Biotechnology Reports**, v. 8, n. 1, p. 23–28, 2014.

FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Plant Science Letters**, v. 5, n. 6, p. 359–369, 1975.

_____. Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 99, n. 1, p. 1–8, 1980.

GAI, C. et al. Thermogravimetric and kinetic analysis of thermal decomposition characteristics of low-lipid microalgae. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 139–148, 2013.

GAO, C. et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, v. 87, n. 3, p. 756–761, 2010.

GARCIA-GONZALEZ, J.; SOMMERFELD, M. Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1051–1061, 2015.

GASPAR, T. et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 32, n. 4, p. 272–289, 1996.

GAURAV, K. et al. Molasses-based growth and lipid production by *Chlorella pyrenoidosa*: A potential feedstock for biodiesel. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 3, p. 320–327, 2016.

GEMIN, L. G. **Aplicações foliares de suspensões da microalga *Scenedesmus subspicatus* como biofertilizante no cultivo orgânico do tomateiro**. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. . **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GIM, G. H. et al. Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 2, p. 99–106, 2014.

GIRARD, J.-M. et al. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Research**, v. 5, p. 241–248, 2014.

GOLLO, A. L. et al. Developing a plant culture medium composed of vinasse originating from *Haematococcus pluvialis* culture. **Pakistan Journal of Botany**, v. 48, n. 1, p. 295–303, 2016.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Degaspari, 2000.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V. et al. Medium recycling for *Nannochloropsis gaditana* cultures for aquaculture. **Bioresource technology**, v. 129, p. 430–438, 2013.

GOO, B. G. et al. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource technology**, v. 129, p. 343–350, 2013.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–274, 2009.

GRESSLER, P. et al. Cultivation of *Desmodesmus subspicatus* in a tubular photobioreactor for bioremediation and microalgae oil production. **Environmental Technology**, v. 35, n. 2, p. 209–219, 2014.

GRIMA, E. M. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7–8, p. 491–515, 2003.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide. v. 8, p. 10–14, 1972.

HAKALIN, N. L. S. **Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel**. 155 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

HALAT, L. et al. Epidermal shedding in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae): seasonality, productivity and relationship to harvesting. **Phycologia**, v. 54, n. 6, p. 599–608, 2015.

HANNEN, E. VAN; FINKGODHE, P.; LURLING, M. A revised secondary structure model for the internal transcribed spacer 2 of the green algae *Scenedesmus* and *Desmodesmus* and its implication for the phylogeny of these algae. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 2, p. 203–208, 2002.

HARMAN-WARE, A. E. et al. Microalgae as a renewable fuel source: Fast pyrolysis of *Scenedesmus* sp. **Renewable Energy**, v. 60, p. 625–632, 2013.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HE, H. Z.; LI, H. B.; CHEN, F. Determination of vitamin B1 in seawater and microalgal fermentation media by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Anal Bioanal Chem**, v. 383, p. 875–879, 2005.

HEGEWALD, E. Eine neue unterteilung der gattung *Scenedesmus* Meyen. **Nova Hedwigia**, v. 30, p. 343–376, 1978.

_____. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). **Archiv für Hydrobiologie Supplement 60/ Algological**

Studies, v. 96, p. 1–18, 2000.

HEMPEL, N.; PETRICK, I.; BEHRENDT, F. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1407–1418, 2012.

HENTSCHKE, G. S.; TORGAN, L. C. *Desmodesmus* e *Scenedesmus* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae) em ambientes em ambientes aquáticos na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 61, n. 4, p. 585–601, 2010.

HEYRAUD, A. et al. ¹³C-NMR spectroscopic investigation of α - and β -1,4-D-glucose homooligomers. **Biopolymers**, v. 18, n. 1, p. 167–185, 1979.

HO, S.-H.; CHEN, C.-Y.; CHANG, J.-S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244–252, 2012.

HU, M. et al. Thermogravimetric study on pyrolysis kinetics of *Chlorella pyrenoidos* and bloom-forming cyanobacteria. **Bioresource technology**, v. 177, p. 41–50, 2015.

HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Environmental Effects on Cell Composition, in Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2003.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38–46, 2010.

HUSSAIN, A.; HASNAIN, S. Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 85–92, 2011.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microbial Technology**, v. 27, p. 631–635, 2000.

ISSARAPAYUP, K.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 142, n. 3–4, p. 227–232, 2009.

JÄGER, K. et al. Improvement of maize (*Zea mays* L.) anther culture responses by algae-derived natural substances. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 511–516, 2010.

JANOSKA, A. et al. A liquid foam-bed photobioreactor for microalgae production.

Chemical Engineering Journal, v. 313, p. 1206–1214, 2017.

Jl, F. et al. Isolation of a novel microalgae strain *Desmodesmus* sp. and optimization of environmental factors for its biomass production. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 249–254, 2013.

_____. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 200–207, 2014.

JIANG, L. et al. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3403–3409, 2009.

JIE, M. et al. Preparation and optimization of amino acid chelated micronutrient fertilizer by hydrolyzation of chicken waste feathers and the effects on growth of rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 571–582, 2008.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 2–3, p. 91–110, 2005.

JIRÁSKOVÁ, D. et al. High-throughput screening technology for monitoring phytohormone production in microalgae. **Journal of Phycology**, v. 45, n. 1, p. 108–118, 2009.

JOHNSON, J. L.; FAWLEY, M. W.; FAWLEY, K. P. The diversity of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* (Chlorophyceae) in Itasca State Park, Minnesota, USA. **Phycologia**, v. 46, n. 2, p. 214–229, 2007.

JORDAN, T. et al. Molten imidazole - a starch solvent. **Green Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 1967–1973, 2014.

KAN, Y.; PAN, J. A one-shot solution to bacterial and fungal contamination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* culture by using an antibiotic cocktail. **Journal of Phycology**, v. 46, n. 6, p. 1356–1358, 2010.

KASSIM, M. A. et al. Thermogravimetric analysis and kinetic characterization of lipid-extracted *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. **Algal Research**, v. 6, p. 39–45, 2014.

KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. **Science of The Total Environment**, v. 584–585, p. 1121–1129, 2017.

KATIYAR, R. et al. Heterotrophic cultivation of microalgae in photobioreactor using low cost crude glycerol for enhanced biodiesel production. **Renewable Energy**, v.

113, p. 1359–1365, 2017.

KEBELMANN, K. et al. Intermediate pyrolysis and product identification by TGA and Py-GC/MS of green microalgae and their extracted protein and lipid components. **Biomass and Bioenergy**, v. 49, p. 38–48, 2013.

KESSLER, E. et al. Physiological, biochemical, and Molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). **Plant Biology**, v. 110, n. 3, p. 244–250, 1997.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Chemik**, v. 28, p. 636–641, 2009.

KIM, D. G. et al. Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3163–3168, 2011.

KIM, K. H. et al. Lipase-catalyzed in-situ biosynthesis of glycerol-free biodiesel from heterotrophic microalgae, *Aurantiochytrium* sp. KRS101 biomass. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 472–477, 2016.

KNOSHAUG, E. et al. Use of cultivation data from the algae testbed public private partnership as utilized in NREL's algae state of technology assessments. **National Renewable Energy Laboratory**, n. NREL/TP-5100-67289, p. 16, 2016.

KRETTLE, R. H.; FERNANDES, V. D. O.; JÚNIOR, C. D. Crescimento de *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em meio de cultura à base de NPK e extrato de macrófitas aquáticas. p. 18, 2015.

KUMAR, K. S. et al. Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 329–352, 2015.

KURATKO, C. N.; SALEM, N. Docosahexaenoic acid from algal oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 9, p. 965–976, 2013.

KURD, F.; SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 498–506, 2015.

KURIHARA, H. et al. Inhibitory effect on the alpha-glucosidase reaction by the aggregated state of sulfoquinovosyldiacylglycerol. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 3, p. 536–538, 1997.

KUZ'MINA, N. E. et al. Modification of PMR spectroscopy technique for determination of the molar substitution in hydroxyethyl starch. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 49, n. 8, p. 559–563, 2015.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a pilot-scale sequential-baffled column photobioreactor for biomass and biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 399–410, 2014.

LEE, C. G.; PALSSON, B. O. Light emitting diode-based algal photobioreactor external gas exchange. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 3, p. 257–263, 1995.

LEE, Y. K.; SHEN, H. Basic Culturing Techniques. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

LEITE, G. B. et al. Utilization of biodiesel-derived glycerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 123–130, 2015.

LI, J. et al. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 568–574, 2011.

LI, J. et al. 3 – Cytokinins. In: **Hormone Metabolism and Signaling in Plants**. p. 77–106, 2017.

LI, X. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–5500, 2010.

LIANG, S. et al. Current microalgal health food R & D activities in China. **Hydrobiologia**, v. 512, n. 1–3, p. 45–48, 2004.

LIANG, Y. et al. Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3623–3627, 2010.

LIANG, Y. Producing liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. **Applied Energy**, v. 104, p. 860–868, 2013.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043–1049, 2009.

LIRA, R. D. A. **Estudo do rendimento de biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp. visando a obtenção de biocombustíveis**. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Setor de Engenharia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

LIU, J. et al. Production potential of *Chlorella zofingienesis* as a feedstock for biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8658–8663, 2010.

LIU, K. Characterization of ash in algae and other materials by determination of wet acid indigestible ash and microscopic examination. **Algal Research**, v. 25, n. November 2016, p. 307–321, 2017.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, D. et al. Kinetic analysis and thermal characterization of the microalgae combustion process by thermal analysis coupled to mass spectrometry. **Applied Energy**, v. 114, p. 227–237, 2014.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 265–275, 1951.

LU, Y. et al. Antagonistic roles of abscisic acid and cytokinin during response to nitrogen depletion in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica* expand the evolutionary breadth of phytohormone function. **The Plant Journal**, v. 80, n. 1, p. 52–68, 2014.

LU, Y.; XU, J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 273–282, 2015.

MA, C. et al. Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 111, 2017.

MACHADO, C. T. D. T.; MACHADO, A. T.; FURLANI, Â. M. C. Variação intrapopulacional em milho para características relacionadas com a eficiência de absorção e utilização de fósforo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 1, p. 77–91, 2004.

MACHADO, T. W. M. **Polissacarídeos de microalgas: estudo da capacidade de modulação de bactérias colonizadoras do trato gastrointestinal *in vitro***. 207 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

MALBURG, B. V. **Identificação de fitohormônios no extrato com potencial biotecnológico da microalga *Scenedesmus subspicatus***. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 281–291, 2009.

MARCILLA, A. et al. Characterization of microalgal species through TGA/FTIR analysis: Application to *Nannochloropsis* sp. **Thermochimica Acta**, v. 484, n. 1, p.

41–47, 2009.

MARKETDATAFORECAST, 2016. Disponível em: <http://www.marketdataforecast.com/market-reports/global-biostimulants-market-1370#utm_source=whatech&utm_content=whatech.com/238506>. Acesso em: 19 jun. 2017.

MARKOU, G.; ICONOMOU, D.; MUYLELAERT, K. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v. 13, p. 79–84, 2016.

MARTINS, A. G. et al. Aplicação de bioestimulante em sementes de milho cultivado em solos de diferentes texturas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 4, p. 440–445, 2016.

MARUDHUPANDI, T. et al. Heterotrophic cultivation of *Nannochloropsis salina* for enhancing biomass and lipid production. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 8–16, 2016.

MASNY, A.; BASAK, A.; ŻURAWICZ, E. Effects of foliar applications of Kelpak SI and Goëmar Bm 86 preparations on yield and fruit quality in two strawberry cultivars. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 12, p. 23–27, 2004.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATSUDO, M. C. et al. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 52–57, 2009.

MAZEPA, E. **Potencial atividade bioestimulante vegetal do extrato aquoso da microalga *Scenedesmus subspicatus***. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MAZUR, H.; KONOP, A.; SYNAK, R. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 1, p. 35–42, 2001.

MELO, T. B. DE. **Remoção de nitrato e fosfato presente em efluente sintético, por meio de *Chlorella vulgaris*, com foco preliminar para produção de biodiesel**. 111 f. Monografia (Bacharelado em Engenharia Ambiental) - Setor de Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

MEYEN, F. J. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. **Akad.**

Naturf., v. 14, p. 769–778, 1829.

MFRURAL. Disponível em: <<http://www.mfrural.com.br/detalhe/temos-melaco-165941.aspx>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 1, p. 85–93, 2004.

_____. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 841–846, 2006.

MICHALAK, I. et al. Evaluation of supercritical extracts of algae as biostimulants of plant growth in field trials. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1591, 2016.

MILANO, J. et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180–197, 2016.

MÓGOR, G. et al. **Ação bioestimulante vegetal do extrato e suspensões de microalga *Scenedesmus subspicatus***. PI 1107211-32011, 2011.

MOHAMED, M. S. et al. Kinetics and modeling of microalga *Tetraselmis* sp. FTC 209 growth with respect to its adaptation toward different trophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 30–41, 2014.

MOHAN, S. V. et al. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 169–178, 2015.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109–122, 2006.

MORAES, G. S. **Potencial bioestimulante da biomassa da microalga do gênero *Spirulina* na germinação de sementes e produtividade de plantas e interesse econômico**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015a.

MORAES, J. G. V. **Biofertilizantes: Identificação das barreiras regulatórias e propostas para viabilizar esse insumo agrícola**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) - Escola de Economia, FUNdação Getúlio Vargas, São Paulo, 2015b.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2799–2815, 2006.

MYKLESTAD, S.; HAUG, A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 9, n. 2, p. 125–136, 1972.

NAJAFPOUR, G. D.; SHAN, C. P. Enzymatic hydrolysis of molasses. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 1, p. 91–94, 2003.

NAPIER, R. M. Auxins. In: **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. 2° ed. p. 367–377, 2017.

NETO, D. D. et al. Ação de bioestimulante no desempenho agrônômico de milho e feijão. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 371–379, 2014.

NIKOLIC, R. et al. Effects of cytokinins on in vitro seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 3, p. 187, 2006.

NISHIWAKI, M. et al. Linked references are available on JSTOR for this article: Planta rapid communication somatic embryogenesis induced by the simple application of ab acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, v. 211, n. 5, p. 756–759, 2000.

NOBRE, B. P. et al. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 128–136, 2013.

O'GRADY, J.; MORGAN, J. A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 1, p. 121–125, 2011.

OLIVEIRA, J.; MÓGOR, G.; MÓGOR, A. **Produtividade de beterraba em função da aplicação foliar de biofertilizante** Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2013.

ÖRDÖG, V. et al. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the *Chlorophyta*. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 1, p. 88–95, 2004.

PANGESTUTI, R.; KIN, S.-K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 255–266, 2011.

PARAMAGEETHAM, C.; BABU, G. P.; RAO, J. V. S. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. an important medicinal and neutraceutical plant of India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, n. 1, p. 19–24, 2004.

PAULINA, K. et al. Liquefaction of macroalgae *Enteromorpha* biomass for the

preparation of biopolyols by using crude glycerol. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2017.

PENG, W.; WU, Q.; TU, P. Pyrolytic characteristics of heterotrophic *Chlorella protothecoides* for renewable bio-fuel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 1, p. 5–12, 2001.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307–3312, 2011.

PINTO, L. F. R. **Estudo do crescimento da microalga *Desmodesmus* sp. visando a produção de biodiesel**. 155 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

PLAZA, M. et al. Innovative natural functional ingredients from microalgae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7159–7170, 2009.

POSTMA, P. R. et al. Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 670–679, 2017.

POVERO, G. et al. A systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. April, p. 1–9, 2016.

POVH, J. A. **Reguladores vegetais e bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L.: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas**. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.

QI, J.; KIM, S. M. Characterization and immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from green alga *Chlorella ellipsoidea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 106–114, 2017.

QUEIROZ, M. I. et al. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosystems Engineering**, v. 115, n. 2, p. 195–202, 2013.

RAHEEM, A. et al. Thermogravimetric study of *Chlorella vulgaris* for syngas production. **Algal Research**, v. 12, p. 52–59, 2015.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. D. M.; MOURA, C. W. D. N. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 3, p. 549–566, 2015.

RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.

RAYORATH, P. et al. Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascomyces nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 4, p. 423–429, 2008.

RAZZAK, S. A. et al. Effects of CO₂ concentration and pH on mixotrophic growth of *Nannochloropsis oculata*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1290–1302, 2015.

REN, H. Y. et al. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 143, 2013.

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; PARRY, D. L. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. **Aquaculture**, v. 170, n. 2, p. 147–159, 1999.

RENGASAMY, K. R. R. et al. Quantification of plant growth biostimulants, phloroglucinol and eckol, in four commercial seaweed liquid fertilizers and some by-products. **Algal Research**, v. 20, p. 57–60, 2016.

RIEFLER, M. et al. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **The Plant Cell**, v. 18, n. 1, p. 40–54, 2006.

RIOUX, L. E.; TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 530–537, 2007.

RIZZI, J. **Potencial biotecnológico dos polissacarídeos de microalgas marinhas**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RODOLFI, L. et al. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100–112, 2009.

RODRÍGUEZ, J. D. A.; PALAU, L. C.; LÓPEZ, M. O. A. Extracción y cuatificación de lípidos. In: VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. (Eds.). **Métodos y herramientas analíticas e la evaluación de la biomasa microalgal**. 1ª ed. ed. La Paz: Centro de

Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 2007. p. 41–48.

ROSSI, R. A. DE. **Seleção dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* produtoras de lipídios: otimização dos cultivos e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo a produção de biodiesel**. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

ROY, A. B.; HEWLINS, M. J. E. An improved preparation of cyclohexylammonium allyl and D-glycer-1'-yl 6-deoxy-6-C-sulfonato- α -D-glucopyranosides. **Carbohydrate Research**, v. 310, n. 3, p. 173–176, 1998.

RUBERTO, G.; TRINGALI, C. Secondary metabolites from the leaves of *Feijoa sellowiana* Berg. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21 SPEC. ISS., p. 2947–2951, 2004.

RWEHUMBIZA, V. M.; HARRISON, R.; THOMSEN, L. Alum-induced flocculation of preconcentrated *Nannochloropsis salina*: Residual aluminium in the biomass, FAMES and its effects on microalgae growth upon media recycling. **Chemical Engineering Journal**, v. 200–202, p. 168–175, 2012.

SAA, S. et al. Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. February, p. 1–9, 2015.

SAFAFAR, H. et al. Enhancement of protein and pigment content in two *Chlorella* species cultivated on industrial process water. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 4, n. 4, p. 84, 2016.

SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 431–449, 2006.

SALATI, S. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 82–89, 2017.

SAMORÌ, G. et al. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, v. 47, n. 2, p. 791–801, 2013.

SAMORÌ, G.; SAMORÌ, C.; PISTOCCHI, R. Nutrient removal efficiency and physiological responses of *Desmodesmus communis* at different HRTs and nutrient stress condition using different sources of urban wastewater effluents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 74–89, 2014.

SANCHES-SILVA, L. et al. Thermogravimetric–mass spectrometric analysis of lignocellulosic and marine biomass pyrolysis. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 163–172, 2012.

SANTNER, A.; VILLALOBOS, L. I. A. C.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 301–307, 2009.

SANTOS, V. M. DOS et al. Uso de bioestimulantes no crescimento de plantas de *Zea mays* L. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 3, p. 307–318, 2013.

SASSAKI, G. L. et al. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichen *Dictyonema glabratum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 6, p. 844–847, 1999.

SATISH, L. et al. Effect of seaweed liquid extracts and plant growth regulators on in vitro mass propagation of brinjal (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl and leaf disc explants. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 993–1002, 2015.

SATISH, L. et al. Somatic embryogenesis and regeneration using *Gracilaria edulis* and *Padina boergeresii* seaweed liquid extracts and genetic fidelity in finger millet (*Eleusine coracana*). **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 2083–2098, 2016.

SCAGLIA, B.; POGNANI, M.; ADANI, F. The anaerobic digestion process capability to produce biostimulant: the case study of the dissolved organic matter (DOM) vs. auxin-like property. **Science of The Total Environment**, v. 589, p. 36–45, 2017.

SCHERER, M. D. et al. Environmental study of producing microalgal biomass and bioremediation of cattle manure effluents by microalgae cultivation. **Clean Technologies and Environmental Policy**, 2017.

SEELEY, R. H.; SCHLESINGER, W. H. Sustainable seaweed cutting? The rockweed (*Ascophyllum nodosum*) industry of maine and the maritime provinces. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1249, n. 1, p. 84–103, 2012.

SHAABAN, M. M. Nutritional status and growth of maize plants as affected by green microalgae as soil additives. **Journal of Biological Science**, v. 1, n. 6, p. 475–479, 2001.

SHAABAN, M. M.; EL-SAADY, A.-K. M.; EL-SAYED, A. E. K. B. Green microalgae water extract and micronutrients foliar application as promoters to nutrient balance and growth of wheat plants. **Journal of American Science**, v. 6, n. 9, p. 631–636, 2010.

SHAMALA, T. R.; DRAWERT, F.; LEUPOLD, G. Studies on *Scenedesmus acutus* growth II. Effect of autotrophic and mixotrophic growth on the amino acid and the carbohydrate composition of *Scenedesmus acutus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 6, p. 1301–1317, 1982.

SHEN, X.-F. et al. Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic

cultivation. **Applied Energy**, v. 158, p. 348–354, 2015.

SHIGENAGA, A. M.; ARGUESO, C. T. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 56, p. 174–189, 2016.

SHRIVASTAVA, S.; BANERJEE, M. Algal filtrate: A low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 6, p. 1205–1212, 2009.

SHUBERT, E.; WOZNIAK, E. W.; LIGEZA, S. An autecological investigation of *Desmodemus*: implications for ecology and taxonomy. **Plant Ecology and Evolution**, v. 147, n. 2, p. 202–212, 2014.

SHUBERT, L.; WOZNIAK, E. W. SEM investigation of several non-motile coccoid green algae isolated from aquatic habitats in Poland. **Biologia**, v. 58, n. 4, p. 459–466, 2003.

SHUPING, Z. et al. Pyrolysis characteristics and kinetics of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* using thermogravimetric analyzer. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 359–365, 2010.

SORATANA, K.; LANDIS, A. E. Evaluating industrial symbiosis and algae cultivation from a life cycle perspective. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 13, p. 6892–6901, 2011.

SPINELLI, F. et al. Perspectives on the use of a seaweed extract to moderate the negative effects of alternate bearing in apple trees. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 84, n. Special Issue, p. 131–137, 2009.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

SRIRAM, S.; SEENIVASAN, R. Biophotonic perception on *Desmodemus* sp. VIT growth, lipid and carbohydrate content. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 626–633, 2015.

STANIER, R. Y. et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 2, p. 171–205, 1971.

STIRK, W. A. et al. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 3, p. 215–221, 2002.

STIRK, W. A. et al. Cytokinins in macroalgae. **Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 1, p. 13–24, 2003.

STIRK, W. A. et al. Changes in cytokinin and auxin concentrations in seaweed concentrates when stored at an elevated temperature. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 1, p. 31–39, 2004.

STIRK, W. A. et al. Changes in endogenous cytokinin concentrations in *Chlorella* (Chlorophyceae) in relation to light and the cell cycle. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 2, p. 291–301, 2011.

STIRK, W. A. et al. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. **Journal of Phycology**, v. 49, n. 3, p. 459–467, 2013a.

STIRK, W. A. et al. Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 348–353, 2013b.

STIRK, W. A. et al. Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 79, p. 66–76, 2014.

STIRK, W. A.; STADEN, J. V. Flow of cytokinins through the environment. **Plant Growth Regulation**, v. 62, n. 2, p. 101–116, 2010.

STOLZ, P.; OBERMAYER, B. Manufacturing microalgae for skin care. **Cosmetics & Toiletries**, v. 120, n. 3, p. 99–106, 2005.

SU, Y. et al. Progress of microalgae biofuel's commercialization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, p. 402–411, 2017.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316–4342, 2012.

TAFAZZOLI, M.; GHIASI, M. New Karplus equations for 2JHH, 3JHH, 2JCH, 3JCH, 3JCOCH, 3JCSCH, and 3JCCCH in some aldohexopyranoside derivatives as determined using NMR spectroscopy and density functional theory calculations. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 14, p. 2086–2096, 2007.

TAKAHASHI, E. K. **Tranferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 156 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 2, p. 163–170, 2007.

TARKOWAKÁ, D. et al. Quo vadis plant hormone analysis? **Planta**, v. 240, n. 1, p. 55–76, 2014.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847–859, 2006.

TIETZ, A. et al. Further investigations on the occurrence and the effects of abscisic acid in algae. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 266, p. 259–266, 1989.

TOMINAGA, N.; TAKAHATA, M.; TOMINAGA, H. Effects of NaCl and KNO₃ concentrations on the abscisic-acid content of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta). **Hydrobiologia**, v. 267, n. 1–3, p. 163–168, 1993.

TOSHIO, M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

TRAINOR, F. R. *Scenedesmus* morphogenesis. Trace elements and spine formation. **Journal of Phycology**, v. 5, n. 11, p. 185–190, 1969.

TURON, V. et al. Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: A review. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1843–1854, 2016.

UDVARDI, M. et al. Impacts of agricultural nitrogen on the environment and strategies to reduce these impacts. **Procedia Environmental Sciences**, v. 29, p. 303, 2015.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4021–4028, 2008.

VEGA, B. O. A.; ESQUIVEL, B. C.; VOLTOLINA, D. Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. In: VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. (Eds.). **Métodos y herramientas analíticas e la evaluación de la biomasa microalgal**. 1ª ed. ed. La Paz: Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste (CIBNOR), 2007. p. 27–34.

VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. In: VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. (Eds.). **Métodos y herramientas analíticas e la evaluación de la biomasa microalgal**. 1ª ed. ed. La Paz: Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste (CIBNOR), 2007. p. 21–29.

VINOTH, S.; GURUSARAVANAN, P.; JAYABALAN, N. Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1527–1537, 2014.

VOB, U. et al. Modelling hormonal response and development. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 5, p. 311–319, 2014.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology, and

biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

WANG, B. et al. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707–718, 2008.

WANG, J. et al. A comparative study of thermolysis characteristics and kinetics of seaweeds and fir wood. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1883–1886, 2006.

WANG, J. et al. From microalgae oil to produce novel structured triacylglycerols enriched with unsaturated fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 405–414, 2015.

WANG, S. et al. Analysis on pyrolysis characteristics of seaweed. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3723–3729, 2007.

WANG, S.; WU, Y.; WANG, X. Heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using sucrose as the sole carbon source by co-culture with *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 615–620, 2016.

WANI, S. H. et al. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The Crop Journal**, v. 4, n. 3, p. 162–176, 2016.

WEBER, F. **Uso de bioestimulante no tratamento de soja**. 27 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Sementes) - Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

WEI, A. et al. Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1383–1389, 2009.

WEN, Q. et al. Lipid production for biofuels from hydrolyzate of waste activated sludge by heterotrophic *Chlorella protothecoides*. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 695–698, 2013.

WEN, Z.-Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Science Direct**, v. 21, p. 273–294, 2003.

WERNER, T.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin action in plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 5, p. 527–538, 2009.

WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: ANDERSEN, R. A. (Ed.). **Algal Culturing Techniques**. Oxford: Elsevier Academic Press, 2005. p. 269–285.

WU, Z. et al. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, v. 110, p.

496–502, 2012.

XIA, L. et al. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 402–409, 2014.

XIUFENG, L.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 764–771, 2007.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 499–507, 2006.

YAKHIN, O. I. et al. Biostimulants in plant science: a global perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2049, 2017.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan , with special reference to utilization of biomass and metabolites : a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 487–502, 1996.

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 225–251, 2008.

YAN, D. et al. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6487–6493, 2011.

YANG, J. et al. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 159–165, 2011.

YANG, S. et al. Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 180–185, 2014.

YEH, K.-L.; CHEN, C.-Y.; CHANG, J.-S. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 1–7, 2012.

YOO, C. et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S71–S74, 2010.

ZAMALLOA, C.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. **Applied Energy**, v. 92, p. 733–738, 2012.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8505–8517, 2017.

ZHANG, S. S. et al. Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* with domestic secondary effluent and energy evaluation for biodiesel production. **Environmental technology**, p. 1–8, 2014a.

ZHANG, X. et al. Energy balance and greenhouse gas emissions of biodiesel production from oil derived from wastewater and wastewater sludge. **Renewable Energy**, v. 55, p. 392–403, 2013.

ZHANG, X. et al. Evaluation of an oil-producing green alga *Chlorella* sp. C2 for biological DeNO_x of industrial flue gases. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 17, p. 10497–10504, 2014b.

ZHAO, G. et al. The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 466–471, 2012.

ZHOU, Q. et al. Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of photoperiod. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 196–200, 2015.

APÊNDICE 1

CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE FITORMÔNIO *trans*-ZEATINA

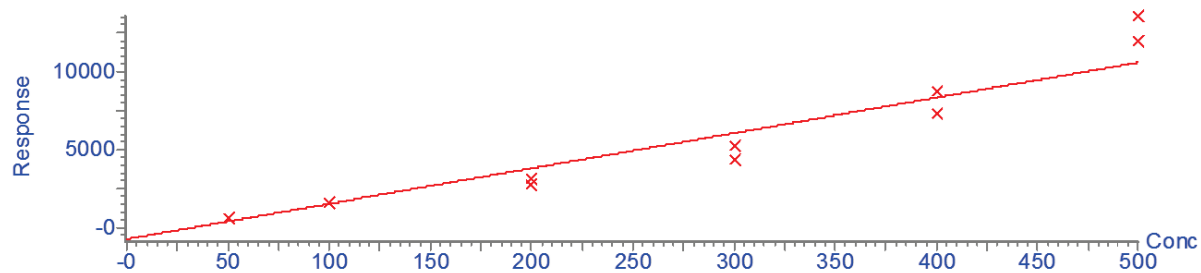
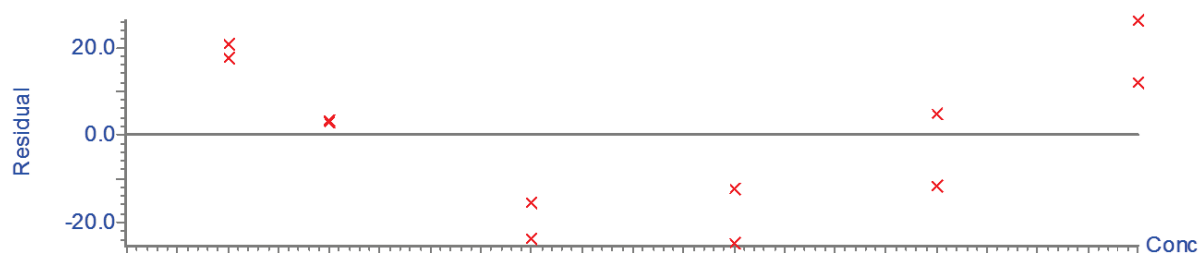
Compound name: ZEATINA

Correlation coefficient: $r = 0.969496$, $r^2 = 0.939922$

Calibration curve: $22.6678 * x + -735.175$

Response type: External Std, Area

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None

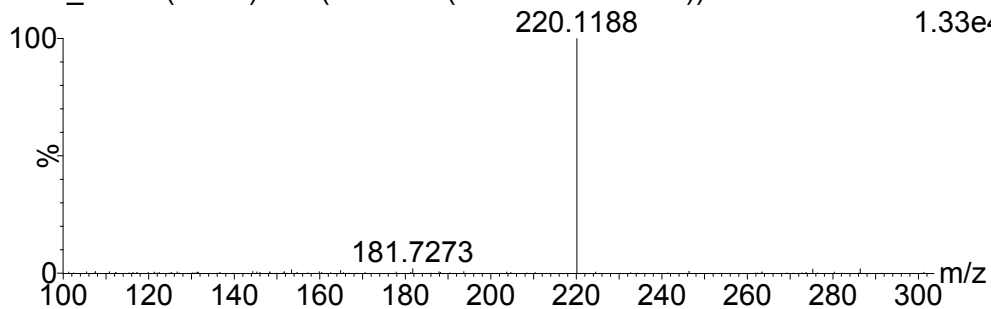


APÊNDICE 2

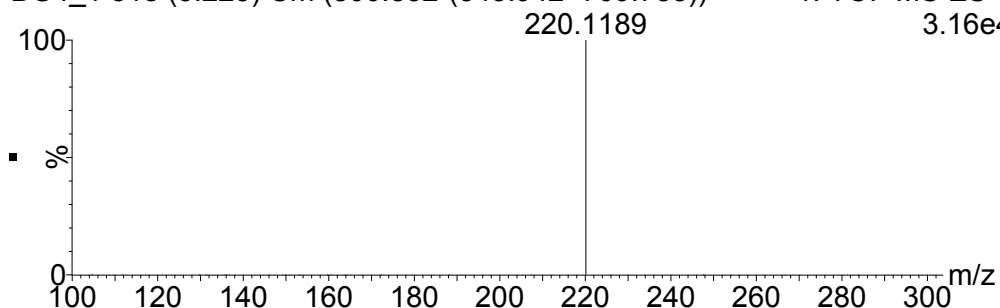
ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA *trans*-ZEATINA IDENTIFICADA NAS FRAÇÕES FRAÇÕES “E” DOS CULTIVOS AUTOTRÓFICOS

metanol : agua (70:30)

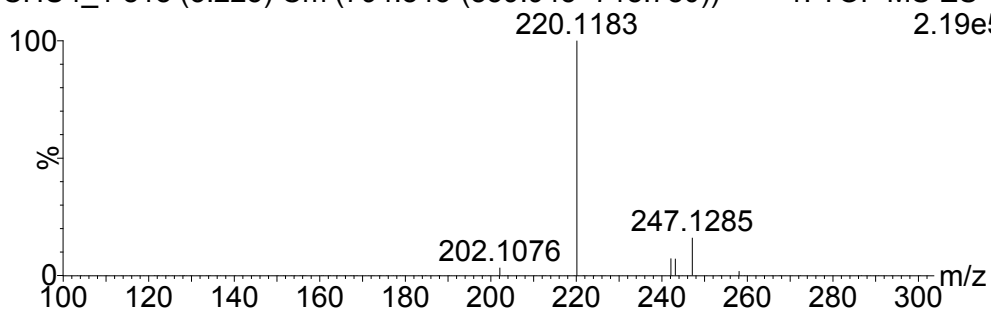
WC4_2 818 (3.225) Cm (799:828-(837:905+755:796))

1: TOF MS ES+
1.33e4

BG4_1 818 (3.225) Cm (800:832-(843:942+709:788))

1: TOF MS ES+
3.16e4

CHU4_1 818 (3.225) Cm (794:843-(859:945+718:780))

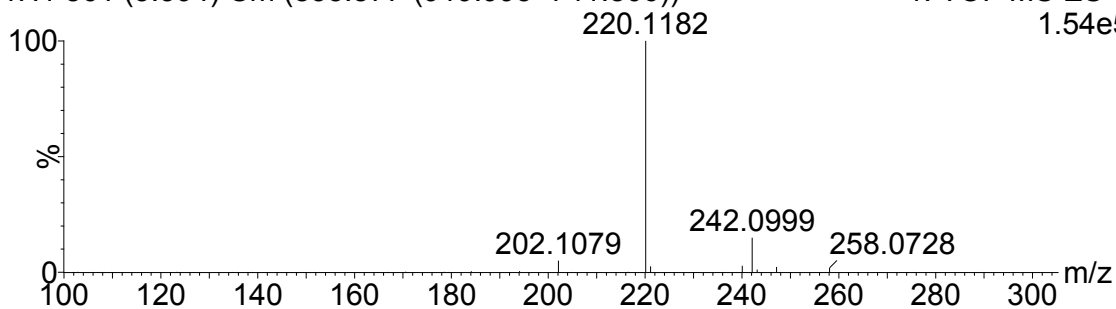
1: TOF MS ES+
2.19e5

APÊNDICE 3

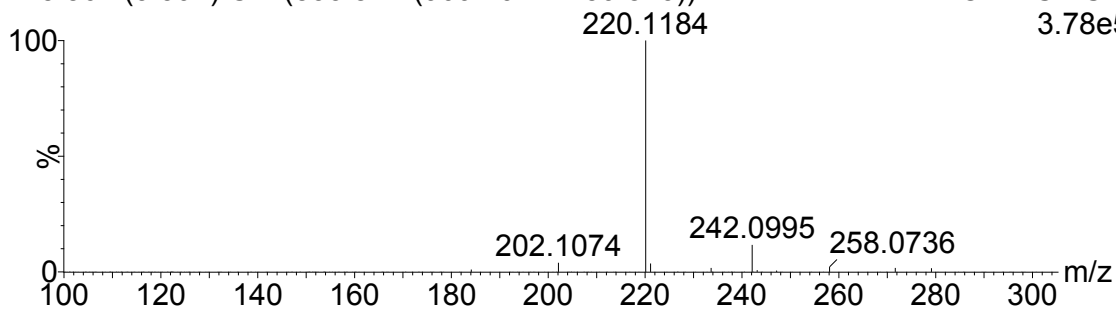
ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA *trans*-ZEATINA IDENTIFICADA NAS FRAÇÕES FRAÇÕES “E” DOS CULTIVOS HETEROTRÓFICOS

metanol : agua (70:30)

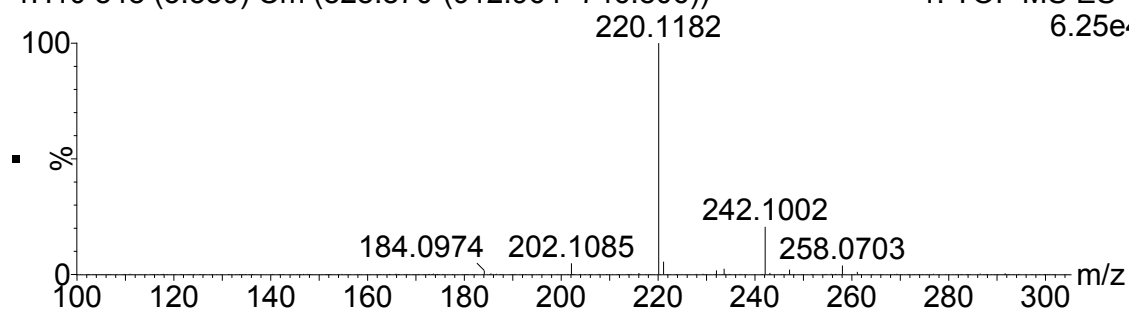
1H1 861 (3.394) Cm (835:877-(919:995+741:806)) 1: TOF MS ES+ 1.54e5



1H5 861 (3.394) Cm (833:877-(909:1014+759:813)) 1: TOF MS ES+ 3.78e5



1H10 848 (3.339) Cm (828:870-(912:964+746:806)) 1: TOF MS ES+ 6.25e4

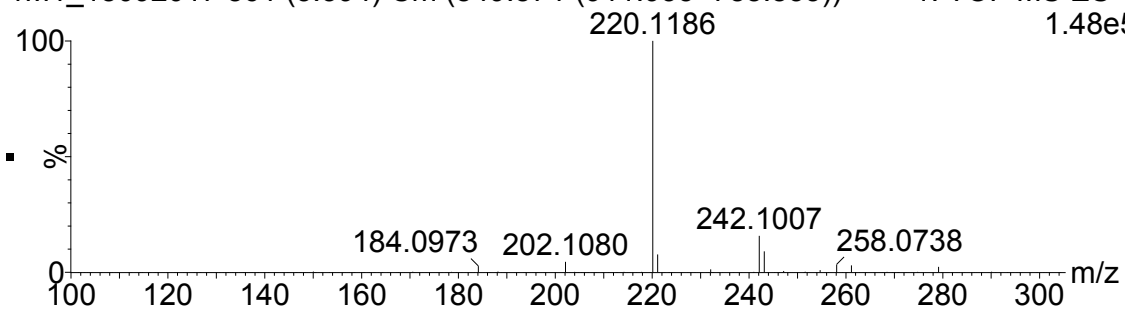


APÊNDICE 4

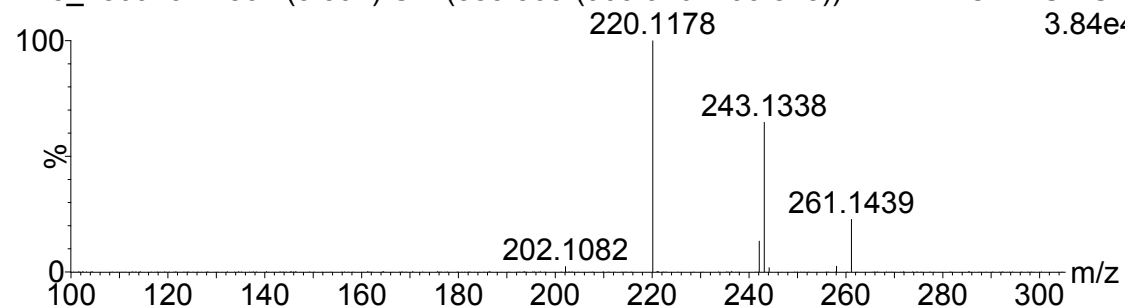
ESPECTRO DE FRAGMENTAÇÃO DA *trans*-ZEATINA IDENTIFICADA NAS FRAÇÕES FRAÇÕES “E” DOS CULTIVOS MIXOTRÓFICOS

metanol : agua (70:30)

1M1_18092017 861 (3.394) Cm (849:874-(911:935+788:833))

1: TOF MS ES+
1.48e5

1M5_18092017 861 (3.394) Cm (853:865-(903:946+793:828))

1: TOF MS ES+
3.84e4

1M10_18092017 861 (3.394) Cm (840:877-(941:1007+741:811))

1: TOF MS ES+
1.52e5